

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年 10 月 11 日 (11.10.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/75104 A1

(51) 国際特許分類: C12N 15/12, 1/21, C07K
14/47, 16/18, C12P 21/02, G01N 33/53, A61K 38/00,
45/00, 48/00, A61P 35/04

Ibaraki (JP). 熊野 聡 (KUMANO, Satoshi) [JP/JP]; 〒
305-0035 茨城県つくば市松代3丁目12番地1-504号
Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/02615

(74) 代理人: 青山 葆, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.); 〒
540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMP
ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

(22) 国際出願日: 2001 年 3 月 29 日 (29.03.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL,
PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ,
UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-093575 2000 年 3 月 30 日 (30.03.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品
工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES,
LTD.) [JP/JP]; 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町
四丁目1番1号 Osaka (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW,
MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大瀧徹也
(OHTAKI, Tetsuya) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つく
ば市春日1丁目7番地9-802号 Ibaraki (JP). 新谷 靖
(SHINTANI, Yasushi) [JP/JP]; 〒305-0821 茨城県つく
ば市春日1丁目7番地9-703号 Ibaraki (JP). 寺尾寧
子 (TERAO, Yasuko) [JP/JP]; 〒305-0034 茨城県つく
ば市大字小野崎985番地 ROYAL ZOA 中山307号

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL PROTEIN, DNA THEREOF AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: 新規蛋白質、そのDNAおよびその製造法

(57) Abstract: A novel protein containing a peptide having a ligand activity to a G protein-coupled receptor protein; amides, esters,
salts, etc. of the peptide; and drugs, etc. containing the same.

(57) 要約:

本発明は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンド活性を有するペ
プチドを含む新規蛋白質およびそのペプチドのアミドもしくはそのエステルまた
はその塩等、ならびにそれを含有する医薬品等に関する。



WO 01/75104 A1

明 細 書

新規蛋白質、そのDNAおよびその製造法

5 技術分野

本発明は、ラット脳幹周辺部およびヒト脳由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンド活性を有するペプチドを含む蛋白質およびそのペプチドのアミドもしくはそのエステルまたはその塩などに関する。

10 背景技術

多くのホルモンや神経伝達物質などの生理活性物質は、細胞膜に存在する特異的なレセプター蛋白質を通じて生体の機能を調節している。これらのレセプター蛋白質のうち多くは共役しているguanine nucleotide-binding protein（以下、G蛋白質と略称する場合がある）の活性化を通じて細胞内のシグナル伝達を行ない、また7個の膜貫通領域を有する共通した構造をもっていることから、G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいは7回膜貫通型レセプター蛋白質（7 TMR）と総称される。

G蛋白質共役型レセプター蛋白質は生体の細胞や臓器の各機能細胞表面に存在し、それら細胞や臓器の機能を調節する分子、例えばホルモン、神経伝達物質および生理活性物質等の標的として生理的に重要な役割を担っている。レセプターは生理活性物質との結合を介してシグナルを細胞内に伝達し、このシグナルにより細胞の賦活や抑制といった種々の反応が惹起される。

各種生体の細胞や臓器の内の複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質、特にG蛋白質共役型レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、各種生体の細胞や臓器の機能を解明し、それら機能と密接に関連した医薬品開発に非常に重要な手段を提供することとなる。

例えば、生体の種々の器官では、多くのホルモン、ホルモン様物質、神経伝達物質あるいは生理活性物質による調節のもとで生理的な機能の調節が行なわれている。特に、生理活性物質は生体内の様々な部位に存在し、それぞれに対応する

レセプター蛋白質を通してその生理機能の調節を行っている。生体内には未知のホルモンや神経伝達物質その他の生理活性物質も多く、それらのレセプター蛋白質の構造に関しても、これまで報告されていないものが多い。さらに、既知のレセプター蛋白質にいてもサブタイプが存在するかどうかについても分かっていないものが多い。

生体における複雑な機能を調節する物質と、その特異的レセプター蛋白質との関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、生体内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を解明し、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

近年、生体内で発現している遺伝子を解析する手段として、cDNAの配列をランダムに解析する研究が活発に行なわれており、このようにして得られたcDNAの断片配列がExpressed Sequence Tag (EST) としてデータベースに登録され、公開されている。しかし、多くのESTは配列情報のみであり、その機能を推定することは困難である。

従来、G蛋白質共役型レセプターと生理活性物質（即ち、リガンド）との結合を阻害する物質や、結合して生理活性物質（即ち、リガンド）と同様なシグナル伝達を引き起こす物質は、これらレセプターの特異的なアンタゴニストまたはアゴニストとして、生体機能を調節する医薬品として活用されてきた。従って、このように生体内での生理発現において重要であるばかりでなく、医薬品開発の標的ともなりうるG蛋白質共役型レセプター蛋白質を新規に見出し、その新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質の特異的リガンドを見出すことは、アゴニスト、アンタゴニストを見出す際に、非常に重要な手段となる。

さらにその際、レセプターの生理機構を明らかにするため、ヒトレセプター遺伝子あるいはリガンド遺伝子に対する例えば齧歯類（ラット、マウスなど）やチンパンジー、サル等のカウンターパート遺伝子を取得し、その遺伝子産物の蛋白化学的諸性質、生物学的諸活性を検索し、また動物体内での質的、量的動態や生理機構を詳細に調べて、ヒトにおける機能を推定することは、有効な医薬を創製する上でも重要な事柄である。

さらに候補となるアゴニスト、アンタゴニストを選択する際に、種差の有無を認識しながら、候補化合物を選定、決定することは、医薬品の創製上欠くべからざる項目となっている。

5 発明の開示

本発明は、上記のように、有用なヒト新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する特異的なヒト由来のリガンドの、ラットおよびマウスホモログリガンド（以下、「本発明のリガンド蛋白質」と称する場合がある）を提供するものである。

10 本発明者らは、これまでにラット脳幹周辺部およびヒト脳由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する細胞内Caイオン濃度上昇活性を有するペプチドを探索した。その結果、ガン転移抑制遺伝子K i S S - 1 (Genomics, 54巻, 145頁-148頁, 1998年) にコードされる蛋白質のC端ペプチドが本レセプターを活性化
15 する作用を有することを明らかにし、K i S S - 1 中のアミノ酸54残基からなるペプチド配列さらにそのC端部分ペプチドにリガンド活性を有することを確認した (特開2000-312590号)。

K i S S - 1 遺伝子産物から切り出されて生成するペプチドには、その遺伝子がガン転移抑制遺伝子であることから、ガン転移抑制活性を有することが期待される。それ以外にも、本遺伝子が胎盤に多量に発現されていることや該G蛋白質
20 共役型レセプター蛋白質のヒト型レセプターであるh O T 7 T 1 7 5 (hはヒト由来であることを示す) が胎盤に多量に発現されていることを鑑み、該ペプチドが胎盤で重要な機能を担っていることも予想される。また、ヒトでは脾臓にもレセプターの発現が比較的高く、脾臓においても本ペプチドは何らかの生理機能を現しているものと期待される。また、ラットリガンド、ラット型レセプターである
25 r O T 7 T 1 7 5 (rはラット由来であることを示す) はともに盲腸、大腸に高い発現量があり、このような臓器においても本ペプチドは何らかの生理機能を現しているものと期待される。本発明者らは、鋭意研究を重ねた結果、ヒト型K i S S - 1 遺伝子配列を基に作成したPCRプライマーを用いて、ラット肝臓cDNAよりヒト型K i s s - 1 遺伝子に相同性の高い配列をコードするcDNA

を単離し、その全塩基配列を解析することに成功した。そして、この塩基配列をアミノ酸配列に翻訳したところ、ヒト型K i S S - 1アミノ酸配列と有意に高い相同性を有する蛋白質をコードすることを確認した。一方、マウス胚cDNAより同様にヒト型K i S S - 1遺伝子に相同性の高い配列をコードするcDNAを
5 単離し、その配列がヒトおよびラット型K i S S - 1アミノ酸配列と有意に高い相同性を有する蛋白質をコードする配列であることを確認した。

本発明者らは、これらの知見に基づいて、さらに研究を重ねた結果、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

- 10 (1) 配列番号：1または配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする蛋白質またはその塩、
- (2) 該実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：2で表されるアミノ酸配列である上記(1)記載の蛋白質またはその塩、
- (3) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から132から141番
15 目のアミノ酸配列を含有することを特徴とする上記(1)記載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、
- (4) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から127から141番目のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する上記
(3)記載の部分ペプチドまたはその塩、
- 20 (5) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から90から141番目のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有する上記(3)記載の部分ペプチドまたはその塩、
- (6) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列のN末端から94から145番目のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有する上記(1)記
25 載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、
- (7) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列のN末端から110から119番目のアミノ酸配列を含有することを特徴とする上記(1)記載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、
- (8) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列のN末端から105から119番

目のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する上記

(7) 記載の部分ペプチドまたはその塩、

(9) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列のN末端から68から119番目のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有する上記(7) 記

5 載の部分ペプチドまたはその塩、

(10) 上記(1) 記載の蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

(11) 上記(3)、(6) または(7) 記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド、

10 (12) DNAである上記(10) または(11) 記載のポリヌクレオチド、

(13) 配列番号：4、配列番号：5または配列番号：6で表される塩基配列を有する上記(10) 記載のポリヌクレオチド、

(14) 上記(10) または(11) 記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター、

15 (15) 上記(14) 記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体、

(16) 上記(15) 記載の形質転換体を培養し、上記(1) 記載の蛋白質または上記(3)、(6) もしくは(7) 記載の部分ペプチドを生成・蓄積せしめることを特徴とする上記(1) 記載の蛋白質もしくはその塩または上記(3)、(6) もしくは(7) 記載の部分ペプチドまたはその塩の製造方法、

20 (17) 上記(1) 記載の蛋白質もしくはその塩または上記(3)、(6) もしくは(7) 記載の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体、

(18) 上記(1) 記載の蛋白質または上記(3)、(6) もしくは(7) 記載の部分ペプチドのシグナル伝達を不活性化する中和抗体である上記(17) 記載の抗体、

25 (19) 上記(1) 記載の蛋白質もしくはその塩または上記(3)、(6) もしくは(7) 記載の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、レセプターと上記(1) 記載の蛋白質もしくはその塩または上記(3)、(6) もしくは(7) 記載の部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、

(20) 上記(1)記載の蛋白質もしくはその塩または上記(3)、(6)もしくは(7)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、レセプターと上記(1)記載の蛋白質もしくはその塩または上記(3)、(6)もしくは(7)記載の部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キット、

(21) レセプターが配列番号：7、配列番号：8または配列番号：24で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有することを特徴とする蛋白質またはその塩である上記(19)記載のスクリーニング方法または上記(20)記載のスクリーニング用キット、

(22) 上記(19)記載のスクリーニング方法または上記(20)記載のスクリーニング用キットを用いて得ることのできる、レセプターと上記(1)または上記(3)ないし(5)のいずれか1項記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩、

(23) アゴニストである上記(22)記載の化合物またはその塩、

(24) 上記(19)記載のスクリーニング方法または上記(20)記載のスクリーニング用キットを用いて得ることのできる、レセプターと上記(1)記載の蛋白質もしくはその塩または上記(3)、(6)もしくは(7)記載の部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬組成物、

(25) 癌転移抑制剤である上記(24)記載の医薬組成物、

(26) 上記(17)記載の抗体を用いることを特徴とする、上記(1)記載の蛋白質または上記(3)、(6)もしくは(7)記載の部分ペプチドの定量方法、

(27) 上記(1)記載の蛋白質もしくはその塩または上記(3)、(6)もしくは(7)記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬組成物、

(28) 癌転移抑制剤である上記(27)記載の医薬組成物などに関する。

図面の簡単な説明

図1は、ヒト型、マウス型1、マウス型2およびラット型のKiSS-1蛋白

質のアミノ酸配列を比較した図である。これら4種のホモログすべてにおいて同一のアミノ酸を*で示す。アミノ酸は慣用的な1文字標記で表す。

発明を実施するための最良の形態

- 5 本発明の蛋白質は、上記のヒト新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質（h O T 7 T 1 7 5）に対する特異的なヒト由来のリガンドの、ラットおよびマウスのホモログ、ならびにそれらの成熟形態である。

- これらの蛋白質は、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、サル、ラット、マウス、モルモット、ウサギ、ブタ、ヒツジ、ウシ、サル等）のあらゆる細胞（例えば、
10 脾細胞、神経細胞、グリア細胞、膵臓β細胞、骨髄細胞、メサングウム細胞、ランゲルハンス細胞、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、繊維芽細胞、繊維細胞、筋細胞、脂肪細胞、免疫細胞（例、マクロファージ、T細胞、B細胞、ナチュラルキラー細胞、肥満細胞、好中球、好塩基球、好酸球、単球）、巨核球、滑膜細胞、軟骨細胞、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞、乳腺細胞、肝細胞もしくは間質細胞、
15 またはこれら細胞の前駆細胞、幹細胞もしくはガン細胞など）や血球系の細胞、またはそれらの細胞が存在するあらゆる組織、例えば、脳、脳の各部位（例、嗅球、扁桃核、大脳基底核、海馬、視床、視床下部、視床下核、大脳皮質、延髄、小脳、後頭葉、前頭葉、側頭葉、被殻、尾状核、脳幹、黒質）、脊髄、下垂体、胃、膵臓、腎臓、肝臓、生殖腺、甲状腺、胆のう、骨髄、副腎、皮膚、筋肉、肺、
20 消化管（例、大腸、小腸）、血管、心臓、胸腺、脾臓、顎下腺、末梢血、末梢血球、前立腺、睾丸、精巣、卵巣、胎盤、子宮、骨、関節、骨格筋など（特に、脳や脳の各部位）に由来する蛋白質であってもよく、また合成蛋白質であってもよい。

- 本発明の蛋白質は、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に特異的に結合する性質
25 を有する。G蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、ヒト由来のO T 7 T 1 7 5、ラット由来のO T 7 T 1 7 5、またはサル、マウス等の哺乳動物のO T 7 T 1 7 5ホモログ等が挙げられる。本発明の蛋白質は、具体的には、マウス型1およびマウス型2と称されるマウス由来の蛋白質（それぞれ配列番号：1および配列番号：2に示すアミノ酸配列を含有）、ならびにラット型の蛋白質（配列番

号：3に示すアミノ酸配列を含有）、さらにそれらの蛋白質の成熟体ポリペプチドを包含する。マウス型1の成熟体ポリペプチドは配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から90から141番目のアミノ酸配列を有する蛋白質であり、マウス型2の成熟体ポリペプチドは配列番号：2で表されるアミノ酸配列のN末端から94から145番目のアミノ酸配列を有する蛋白質であり、ラット型の成熟体ポリペプチドは配列番号：3で表されるアミノ酸配列のN末端から68から119番目のアミノ酸配列を有する蛋白質である。

本明細書において、「実質的に同一のアミノ酸配列」とは、（1）対照となるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1個または2個）のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、（2）対照となるアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1個または2個）のアミノ酸が付加したアミノ酸配列、（3）対照となるアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～30個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1個または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、または（4）それらを組み合わせたアミノ酸配列を意味する。

具体的には、例えば、配列番号：1または3で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列としては、配列番号：1または3で表されるアミノ酸配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有するアミノ酸配列等が挙げられる。

本発明の蛋白質と実質的に同一のアミノ酸配列を含有する蛋白質、および実質的に同一のアミノ酸配列を有する蛋白質は、本発明の蛋白質と実質的に同質の性質を有している。すなわち、これらの蛋白質はG蛋白質共役型レセプター蛋白質に特異的に結合する性質を有する。好ましいレセプターとしては、ヒト由来のOT7T175（配列番号：7に示す）、ラット由来のOT7T175（配列番号：8に示す）およびマウス由来のOT7T175（配列番号：24に示す）がある。詳細には、かかる性質はG蛋白質共役型レセプター蛋白質への結合活性、シグナル情報伝達作用（活性）等が挙げられ、それらの性質または活性が同等

(例えば、約0.01~100倍、好ましくは約0.5~20倍、より好ましくは約0.5~2倍)であることが好ましいが、これらの活性の程度や蛋白質の分子量等の量的要素は異なってもよい。これらの活性の測定は、自体公知の方法に準じて行うことができるが、例えば、後述するスクリーニング法に従って測定することもできる。本発明の蛋白質と実質的に同質の性質を有する蛋白質もまた、本発明の蛋白質に包含される。

本明細書において本発明の蛋白質を記載する場合、ペプチド標記の慣例に従って左端がN末端(アミノ末端)、右端がC末端(カルボキシル末端)である。配列番号:1で表わされるアミノ酸配列を含有するリガンド蛋白質をはじめとする、本発明のリガンド蛋白質は、C末端が通常カルボキシル基($-\text{COOH}$)またはカルボキシレート($-\text{COO}^-$)であるが、C末端がアミド($-\text{CONH}_2$)またはエステル($-\text{COOR}$)であってもよい。

ここでエステルにおけるRとしては、例えば、メチル、エチル、*n*-プロピル、イソプロピルもしくは*n*-ブチルなどの C_{1-6} アルキル基、例えば、シクロペンチル、シクロヘキシルなどの C_{3-8} シクロアルキル基、例えば、フェニル、 α -ナフチルなどの C_{6-12} アリール基、例えば、ベンジル、フェネチルなどのフェニル- C_{1-2} アルキル基もしくは α -ナフチルメチルなどの α -ナフチル- C_{1-2} アルキル基などの C_{7-14} アラルキル基のほか、経口用エステルとして汎用されるピバロイルオキシメチル基などが用いられる。

本発明のリガンド蛋白質がC末端以外にカルボキシル基(またはカルボキシレート)を有している場合、カルボキシル基がアミド化またはエステル化されているものも本発明のリガンド蛋白質に含まれる。この場合のエステルとしては、例えば上記したC末端のエステルなどが用いられる。

さらに、本発明のリガンド蛋白質には、上記した蛋白質において、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基(例えば、ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など)で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したグルタミル基がピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基(例えば、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{COOH}$ 、アミノ基、イミダゾール基、インドール基、グアニジノ基など)が適当な保護基(例えば、

ホルミル基、アセチルなどの C_{2-6} アルカノイル基などの C_{1-6} アシル基など）で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの複合蛋白質なども含まれる。

5 本発明のリガンド蛋白質の具体例としては、例えば、配列番号：1および2で表わされるアミノ酸配列を含有するマウス由来のリガンド蛋白質（それぞれマウス型1およびマウス型2）または配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有するラット由来のリガンド蛋白質（ラット型）などがある。

10 本発明のリガンド蛋白質の部分ペプチド（以下、部分ペプチドと略記する場合がある）も本発明に包含され、本発明のリガンド蛋白質の部分ペプチドであれば何れのものであってもよいが、上記した性質を有するものであることが必須である。

15 具体的には、配列番号：1、2または3で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質の部分ペプチドとしては、上記したこれらの成熟体が典型例である。さらにそれらの成熟体の部分ペプチドも、上記した性質を有しているかぎり、本発明に包含されることはいうまでもない。

すなわち、配列番号：1、2または3で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質の部分ペプチドとして具体的には、

20 (a) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から90から141番目のアミノ酸配列を有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(b) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から134から141番目のアミノ酸配列を含有し、8ないし52個のアミノ酸残基からなるポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

25 (c) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列のN末端から94から145番目のアミノ酸配列を有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(d) 配列番号：2で表されるアミノ酸配列のN末端から138から145番目のアミノ酸配列を含有し、8ないし52個のアミノ酸残基からなるポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(e) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列のN末端から68から119番目のアミノ酸配列を有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

5 (f) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列のN末端から112から119番目のアミノ酸配列を含有し、8ないし52個のアミノ酸残基からなるポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(g) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から132から141番目のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

10 (h) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から127から141番目のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

15 (i) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列のN末端から110から119番目のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

(j) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列のN末端から105から119番目のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩
などが挙げられる。

20 上記(a)～(j)に記載のポリペプチドはそのC末端がアミド体であるものが好ましい。

実質的に同一のアミノ酸配列とは、これらのアミノ酸配列と約80%以上、好ましくは約90%以上、さらに好ましくは約95%以上、最も好ましくは約99%以上の相同性を有するアミノ酸配列をいう。

25 このうち、好ましくは上記(a)～(j)に記載のポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩であり、さらに好ましくは、

i) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から132から141番目のアミノ酸配列を有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

ii) 配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から127から141番目のアミノ酸配列を有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

5 iii) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列のN末端から110から119番目のアミノ酸配列を有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩、

10 iv) 配列番号：3で表されるアミノ酸配列のN末端から105から119番目のアミノ酸配列を有するポリペプチドもしくはそのアミドもしくはそのエステルまたはその塩である。これらのポリペプチドはそのC末端がアミド体であるものが好ましい。

また、本発明の部分ペプチドは、上記アミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に1または2個以上（好ましくは、1～20個程度、より好ましくは1～10個程度、さらに好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列中の1または2個以上（好ましくは、1～10個程度、より好ましくは数個（1または2個））のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよい。

20 また、本発明の部分ペプチドはC末端が通常カルボキシル基（ $-\text{COOH}$ ）またはカルボキシレート（ $-\text{COO}^-$ ）であるが、前記した本発明のリガンド蛋白質のごとく、C末端がアミド（ $-\text{CONH}_2$ ）またはエステル（ $-\text{COOR}$ ）

（Rは上記と同意義を示す）であってもよい。

25 さらに、本発明の部分ペプチドには、前記した本発明のリガンド蛋白質と同様に、N末端のメチオニン残基のアミノ基が保護基で保護されているもの、N端側が生体内で切断され生成したGlnがピログルタミン酸化したもの、分子内のアミノ酸の側鎖上の置換基が適当な保護基で保護されているもの、あるいは糖鎖が結合したいわゆる糖ペプチドなどの複合ペプチドなども含まれる。

本発明のリガンド蛋白質またはその部分ペプチドの塩としては、生理学的に許容される塩基もしくは酸との塩が用いられ、とりわけ生理学的に許容される酸付加塩が好ましい。このような塩としては、例えば無機酸（例えば、塩酸、リン酸、

臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは有機酸(例えば、酢酸、ギ酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、リンゴ酸、蔞酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸)との塩などが用いられる。

5 本発明のリガンド蛋白質またはその塩は、前述したヒトや哺乳動物の細胞または組織から自体公知のリガンド蛋白質の精製方法によって製造することもできるし、後述する本発明のリガンド蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによっても製造することができる。また、後述の蛋白質合成法またはこれに準じた方法により製造することもできる。

10 ヒトや哺乳動物の組織または細胞から製造する場合、ヒトや哺乳動物の組織または細胞をホモジナイズした後、酸などで抽出を行ない、該抽出液を逆相クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィーを組み合わせることにより精製単離することができる。

本発明のリガンド蛋白質、その部分ペプチドもしくはそれらの塩またはそれらのアミド体の合成には、通常市販の蛋白質合成用樹脂を用いることができる。その
15 ような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ベンズヒドリルアミン樹脂、アミノメチル樹脂、4-ベンジルオキシベンジルアルコール樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂、PAM樹脂、4-ヒドロキシメチルメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、ポリアクリルアミド樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-ヒドロキシメチル)フェノキシ樹脂、4-(2',4'-ジメトキシフェニル-Fmocアミノエチル)フェノキシ樹脂などを挙げる
20 ことができる。このような樹脂を用い、 α -アミノ基と側鎖官能基を適当に保護したアミノ酸を、目的とする蛋白質の配列通りに、自体公知の各種縮合方法に従い、樹脂上で縮合させる。反応の最後に樹脂から蛋白質を切り出すと同時に各種保護基を除去し、さらに高希釈溶液中で分子内ジスルフィド結合形成反応を実施
25 し、目的の蛋白質またはそれらのアミド体を取得する。

上記した保護アミノ酸の縮合に関しては、蛋白質合成に使用できる各種活性化試薬を用いることができるが、特に、カルボジイミド類がよい。カルボジイミド類としては、DCC、N,N'-ジイソプロピルカルボジイミド、N-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロリル)カルボジイミドなどが用いられる。これらによる活性化に

はラセミ化抑制添加剤（例えば、HOBt, HOOBt）とともに保護アミノ酸を直接樹脂に添加するかまたは、対称酸無水物またはHOBtエステルあるいはHOOBtエステルとしてあらかじめ保護アミノ酸の活性化を行なった後に樹脂に添加することができる。

- 5 保護アミノ酸の活性化や樹脂との縮合に用いられる溶媒としては、蛋白質縮合反応に使用しうることが知られている溶媒から適宜選択されうる。例えば、N, N-ジメチルホルムアミド, N, N-ジメチルアセトアミド, N-メチルピロリドンなどの酸アミド類、塩化メチレン, クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、トリフルオロエタノールなどのアルコール類、ジメチルスルホキシドなどの
- 10 スルホキシド類、ピリジン, ジオキサン, テトラヒドロフランなどのエーテル類、アセトニトリル, プロピオニトリルなどのニトリル類、酢酸メチル, 酢酸エチルなどのエステル類あるいはこれらの適宜の混合物などが用いられる。反応温度は蛋白質結合形成反応に使用され得ることが知られている範囲から適宜選択され、通常約-20℃~50℃の範囲から適宜選択される。活性化されたアミノ酸誘導
- 15 体は通常1.5~4倍過剰で用いられる。ニンヒドリン反応を用いたテストの結果、縮合が不十分な場合には保護基の脱離を行うことなく縮合反応を繰り返すことにより十分な縮合を行なうことができる。反応を繰り返しても十分な縮合が得られないときには、無水酢酸またはアセチルイミダゾールを用いて未反応アミノ酸をアセチル化することによって、後の反応に影響を与えないようにすることができる。
- 20

原料のアミノ基の保護基としては、例えば、Z、Boc、ターシャリーペンチルオキシカルボニル、イソボルニルオキシカルボニル、4-メトキシベンジルオキシカルボニル、Cl-Z、Br-Z、アダマンチルオキシカルボニル、トリフルオロアセチル、フタロイル、ホルミル、2-ニトロフェニルスルフェニル、ジフェニルホスフィノチオイル、Fmocなどが用いられる。

25

カルボキシ基は、例えば、アルキルエステル化（例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ターシャリーブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、シクロヘプチル、シクロオクチル、2-アダマンチルなどの直鎖状、分枝状もしくは環状アルキルエステル化）、アラルキルエステル化（例えば、ベンジルエステ

ル、4-ニトロベンジルエステル、4-メトキシベンジルエステル、4-クロロベンジルエステル、ベンズヒドリルエステル化)、フェナシルエステル化、ベンジルオキシカルボニルヒドラジド化、ターシャリープトキシカルボニルヒドラジド化、トリチルヒドラジド化などによって保護することができる。

- 5 セリンの水酸基は、例えば、エステル化またはエーテル化によって保護することができる。このエステル化に適する基としては、例えば、アセチル基などの低級アルカノイル基、ベンゾイル基などのアロイル基、ベンジルオキシカルボニル基、エトキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などが用いられる。また、エーテル化に適する基としては、例えば、ベンジル基、テトラヒドロピラニル基、
10 t-ブチル基などである。

 チロシンのフェノール性水酸基の保護基としては、例えば、Bzl、Cl₂-Bzl、2-ニトロベンジル、Br-Z、ターシャリープチルなどが用いられる。

- ヒスチジンのイミダゾールの保護基としては、例えば、Tos、4-メトキシ-
2,3,6-トリメチルベンゼンスルホニル、DNP、ベンジルオキシメチル、Bum、Boc、
15 Trt、Fmocなどが用いられる。

- 原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、対応する酸無水物、アジド、活性エステル〔アルコール（例えば、ペンタクロロフェノール、
2,4,5-トリクロロフェノール、2,4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、パラニトロフェノール、HONB、N-ヒドロキシスクシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、HOBt）とのエステル〕などが用いられる。原料のアミノ基の活性化されたものとしては、例えば、対応するリン酸アミドが用いられる。
20

- 保護基の除去（脱離）方法としては、例えば、Pd-黒あるいはPd-炭素などの触媒の存在下での水素気流中での接触還元や、また、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸あるいはこれらの混合液などによる酸処理や、ジイソプロピルエチルアミン、トリエチルアミン、ピペリジン、ピペラジンなどによる塩基処理、また液体アンモニア中ナトリウムによる還元なども用いられる。上記酸処理による脱離反応は、一般に約-20℃～40℃の温度で行なわれるが、酸処理においては、例えば、アニソール、フェノール、チオアニソール、メタクレゾール、パラクレゾール、ジメチルスル
25

フィド、1,4-ブタンジチオール、1,2-エタンジチオールなどのようなカチオン捕捉剤の添加が有効である。また、ヒスチジンのイミダゾール保護基として用いられる2,4-ジニトロフェニル基はチオフェノール処理により除去され、トリプトファンのインドール保護基として用いられるホルミル基は上記の1,2-エタンジチオール、1,4-ブタンジチオールなどの存在下の酸処理による脱保護以外に、希水酸化ナトリウム溶液、希アンモニアなどによるアルカリ処理によっても除去される。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護ならびに保護基、およびその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などは公知の基または公知の手段から適宜選択しうる。

10 蛋白質のアミド体を得る別の方法としては、例えば、まず、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基をアミド化して保護した後、アミノ基側にペプチド（蛋白質）鎖を所望の鎖長まで延ばした後、該ペプチド鎖のN末端の α -アミノ基の保護基のみを除いた蛋白質とC末端のカルボキシル基の保護基のみを除去した蛋白質とを製造し、この両蛋白質を上記したような混合溶媒中で縮合させる。

15 縮合反応の詳細については上記と同様である。縮合により得られた保護蛋白質を精製した後、上記方法によりすべての保護基を除去し、所望の粗蛋白質を得ることができる。この粗蛋白質は既知の各種精製手段を駆使して精製し、主要画分を凍結乾燥することで所望の蛋白質のアミド体を得ることができる。

20 蛋白質のエステル体を得るには、例えば、カルボキシ末端アミノ酸の α -カルボキシル基を所望のアルコール類と縮合しアミノ酸エステルとした後、蛋白質のアミド体と同様にして、所望の蛋白質のエステル体を得ることができる。

本発明のリガンド蛋白質の部分ペプチドは、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のリガンド蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば、固相合成法、

25 液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明のリガンド蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残余部分とを縮合させ、生成物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としては、例えば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

①M. Bodanszky および M. A. Ondetti、ペプチド シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966年)

②SchroederおよびLuebke、ザ ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965年)

5 ③泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株) (1975年)

④矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島治明監修、続医薬品の開発 第14巻 ペプチド合成 広川書店

10 また、反応後は通常の精製法、たとえば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明の部分ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られる部分ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって遊離体に変換することができる。

15 本発明のリガンド蛋白質をコードするポリヌクレオチドとしては、前述した本発明のリガンド蛋白質をコードする塩基配列 (DNAまたはRNA、好ましくはDNA) を含有するものであればいかなるものであってもよい。該ポリヌクレオチドとしては、本発明のリガンド蛋白質をコードするDNA、mRNA等のRNAであり、二本鎖であっても、一本鎖であってもよい。二本鎖の場合は、二本鎖DNAまたはDNA:RNAのハイブリッドでもよい。一本鎖の場合は、センス鎖 (即ち、コード鎖) であっても、アンチセンス鎖 (即ち、非コード鎖) であつてもよい。

20 本発明のリガンド蛋白質をコードするポリヌクレオチドを用いて、例えば、公知の実験医学増刊「新PCRとその応用」15(7)、1997記載の方法またはそれに準じた方法により、本発明のリガンド蛋白質のmRNAを定量することができる。

25 本発明のリガンド蛋白質をコードするDNAとしては、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりtotalRNAまたは

mRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction（以下、RT-PCR法と略称する）によって増幅することもできる。

具体的には、本発明のリガンド蛋白質をコードするDNAとしては、例えば、
5 配列番号：4～6の何れかで表わされる塩基配列を含有するDNA、または配列番号：4～6の何れかで表わされる塩基配列とハイストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のリガンド蛋白質と実質的に同質の活性（例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など）を有する蛋白質をコードするDNAであれば何れのものでもよい。

10 配列番号：4～6の何れかで表わされる塩基配列とハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：4～6の何れかで表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

15 ハイブリダイゼーションは、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法、例えば、モレキュラー・クローニング（Molecular Cloning）2nd（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989）に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。より好ましくは、ハイストリンジェントな条件に従って行なうことができる。

20 該ハイストリンジェントな条件とは、例えば、ナトリウム濃度が約19～40 mM、好ましくは約19～20 mMで、温度が約50～70℃、好ましくは約60～65℃の条件を示す。特に、ナトリウム濃度が約19 mMで温度が約65℃の場合が最も好ましい。

25 より具体的には、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：4で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。また、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：5で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。さらに配列番号：3で表わされるアミノ酸配列を含有する蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：6で表わされる塩基配列を

有するDNAなどが用いられる。

本発明のリガンド蛋白質をコードするDNAの塩基配列の一部、または該DNAと相補的な塩基配列の一部を含有してなるポリヌクレオチドとは、下記の本発明の部分ペプチドをコードするDNAを包含するだけではなく、RNAをも包含する意味で用いられる。

本発明に従えば、本発明のリガンド蛋白質遺伝子の複製又は発現を阻害することのできるアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）を、クローン化したあるいは決定された蛋白質をコードするDNAの塩基配列情報に基づき設計し、合成しうる。そうしたポリヌクレオチド（核酸）は、蛋白質遺伝子のRNAとハイブリダイズすることができ、該RNAの合成又は機能を阻害することができるか、あるいはリガンド蛋白質関連RNAとの相互作用を介してリガンド蛋白質遺伝子の発現を調節・制御することができる。リガンド蛋白質関連RNAの選択された配列に相補的なポリヌクレオチド、及びリガンド蛋白質関連RNAと特異的にハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドは、生体内及び生体外でリガンド蛋白質遺伝子の発現を調節・制御するのに有用であり、また病気などの治療又は診断に有用である。用語「対応する」とは、遺伝子を含めたヌクレオチド、塩基配列又は核酸の特定の配列に相同性を有するあるいは相補的であることを意味する。ヌクレオチド、塩基配列又は核酸とペプチド（蛋白質）との間で「対応する」とは、ヌクレオチド（核酸）の配列又はその相補体から誘導される指令にあるペプチド（蛋白質）のアミノ酸を通常指している。リガンド蛋白質遺伝子の5' 端ヘアピンループ、5' 端6-ベースペア・リピート、5' 端非翻訳領域、ポリペプチド翻訳開始コドン、蛋白質コード領域、ORF翻訳開始コドン、3' 端非翻訳領域、3' 端パリンドローム領域、及び3' 端ヘアピンループは好ましい対象領域として選択しうるが、リガンド蛋白質遺伝子内の如何なる領域も対象として選択しうる。

目的核酸と、対象領域の少なくとも一部に相補的なポリヌクレオチドとの関係は、対象物とハイブリダイズすることができるポリヌクレオチドとの関係は、「アンチセンス」であるということができる。アンチセンス・ポリヌクレオチドは、2-デオキシ-D-リボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、D

ーリボースを含有しているポリデオキシヌクレオチド、プリン又はピリミジン塩基のN-グリコシドであるその他のタイプのポリヌクレオチド、あるいは非ヌクレオチド骨格を有するその他のポリマー（例えば、市販の蛋白質核酸及び合成配列特異的な核酸ポリマー）又は特殊な結合を含有するその他のポリマー（但し、
5 該ポリマーはDNAやRNA中に見出されるような塩基のペアリングや塩基の付着を許容する配置をもつヌクレオチドを含有する）などが挙げられる。それらは、2本鎖DNA、1本鎖DNA、1本鎖RNA、さらにDNA：RNAハイブリッドであることができ、さらに非修飾ポリヌクレオチド（又は非修飾オリゴヌクレオチド）、さらには公知の修飾の付加されたもの、例えば当該分野で知られた標識のあるもの、キャップの付いたもの、メチル化されたもの、1個以上の天然の
10 ヌクレオチドを類縁物で置換したもの、分子内ヌクレオチド修飾のされたもの、例えば非荷電結合（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホルアミデート、カルバメートなど）を持つもの、電荷を有する結合又は硫黄含有結合（例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど）を持つもの、
15 例えば蛋白質（ヌクレアーゼ、ヌクレアーゼ・インヒビター、トキシン、抗体、シグナルペプチド、ポリーラーリジンなど）や糖（例えば、モノサッカライドなど）などの側鎖基を有しているもの、インターカレント化合物（例えば、アクリジン、プロラレンなど）を持つもの、キレート化合物（例えば、金属、放射性性をもつ金属、ホウ素、酸化性の金属など）を含有するもの、アルキル化剤を含有するもの、修飾された結合を持つもの（例えば、 α アノマー型の核酸など）であ
20 ってもよい。ここで「ヌクレオシド」、「ヌクレオチド」及び「核酸」とは、プリン及びピリミジン塩基を含有するのみでなく、修飾されたその他の複素環型塩基をもつようなものを含んでいてもよい。こうした修飾物は、メチル化されたプリン及びピリミジン、アシル化されたプリン及びピリミジン、あるいはその他の
25 複素環を含むものであってよい。修飾されたヌクレオシド及び修飾されたヌクレオチドはまた糖部分が修飾されていてよく、例えば1個以上の水酸基がハロゲンとか、脂肪族基などで置換されていたり、あるいはエーテル、アミンなどの官能基に変換されていてよい。

本発明のアンチセンス・ポリヌクレオチド（核酸）は、RNA、DNA、ある

いは修飾された核酸（RNA、DNA）である。修飾された核酸の具体例としては核酸の硫黄誘導体やチオホスフェート誘導体、そしてポリヌクレオシドアミドやオリゴヌクレオシドアミドの分解に抵抗性のものが挙げられるが、それに限定されるものではない。本発明のアンチセンス核酸は次のような方針で好ましく設計されうる。すなわち、細胞内でのアンチセンス核酸をより安定なものにする、アンチセンス核酸の細胞透過性をより高める、目標とするセンス鎖に対する親和性をより大きなものにする、そしてもし毒性があるならアンチセンス核酸の毒性をより小さなものにする。

こうして修飾は当該分野で数多く知られており、例えば J. Kawakami et al., Pharm Tech Japan, Vol. 8, pp.247, 1992; Vol. 8, pp.395, 1992; S. T. Crooke et al. ed., Antisense Research and Applications, CRC Press, 1993 などに開示がある。

本発明のアンチセンス核酸は、変化せしめられたり、修飾された糖、塩基、結合を含有していて良く、リポゾーム、ミクロスフェアのような特殊な形態で供与されたり、遺伝子治療により適用されたり、付加された形態で与えられることができる。こうして付加形態で用いられるものとしては、リン酸基骨格の電荷を中和するように働くポリリジンのようなポリカチオン体、細胞膜との相互作用を高めたり、核酸の取込みを増大せしめるような脂質（例えば、ホスホリピッド、コレステロールなど）といった粗水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロホルメート、コール酸など）が挙げられる。こうしたものは、核酸の3' 端あるいは5' 端に付着させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオシド結合を介して付着させることができる。その他の基としては、核酸の3' 端あるいは5' 端に特異的に配置されたキャップ用の基で、エキソヌクレアーゼ、RNaseなどのヌクレアーゼによる分解を阻止するためのものが挙げられる。こうしたキャップ用の基としては、ポリエチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当該分野で知られた水酸基の保護基が挙げられるが、それらに限定されるものではない。

アンチセンス核酸の阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体

外の遺伝子発現系、あるいは本発明のリガンド蛋白質の生体内や生体外の翻訳系を用いて調べることができる。該核酸それ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

5 本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、前述した本発明の部分ペプチドをコードする塩基配列を含有するものであればいかなるものであってもよい。また、ゲノムDNA、ゲノムDNAライブラリー、前記した細胞・組織由来のcDNA、前記した細胞・組織由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用するベクターは、バクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいずれであってもよい。また、前記した細胞・組織よりmRNA画分を調製したものをを用いて直接Reverse Transcriptase
10 Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する) によって増幅することもできる。

具体的には、本発明の部分ペプチドをコードするDNAとしては、例えば、
(1) 配列番号：4～6で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を
15 有するDNA、または(2) 配列番号：4～6で表わされる塩基配列とハイストリンジエントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有し、本発明のリガンド蛋白質と実質的に同質の活性(例、リガンド結合活性、シグナル情報伝達作用など)を有するリガンド蛋白質をコードするDNAの部分塩基配列を有するDNA
20 などが用いられる。配列番号：4～6で表わされる塩基配列を有するDNAの部分塩基配列を有するDNAの典型例としては、本発明のリガンド蛋白質の成熟体をコードするDNA等が挙げられる。

配列番号：4～6で表わされる塩基配列ハイブリダイズできるDNAとしては、例えば、配列番号：4～6で表わされる塩基配列と約70%以上、好ましくは約80%以上、より好ましくは約90%以上、最も好ましくは約95%以上の相同性
25 を有する塩基配列を含有するDNAなどが用いられる。

本発明のリガンド蛋白質またはその部分ペプチド(以下、本発明のリガンド蛋白質と略記する場合がある)を完全にコードするDNAのクローニングの手段としては、本発明のリガンド蛋白質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増幅するか、または適当なベクターに組み込んだDN

Aを本発明のリガンド蛋白質の一部あるいは全領域をコードするDNA断片もしくは合成DNAを用いて標識したものとハイブリダイゼーションによって選別することができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning) 2nd (J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行なうことができる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行なうことができる。

DNAの塩基配列の変換は、PCRや公知のキット、例えば、Mut anTM-super Express Km (宝酒造 (株))、Mut anTM-K (宝酒造 (株)) 等を用いて、ODA-LA PCR法、Gapped duplex 法、Kunkel 法等の自公知の方法あるいはそれらに準じる方法に従って行なうことができる。

クローン化された本発明のリガンド蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に翻訳開始コドンとしてのATGを有し、また3'末端側には翻訳終止コドンとしてのTAA、TGAまたはTAGを有していてもよい。これらの翻訳開始コドンや翻訳終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。

本発明のリガンド蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ) 本発明のリガンド蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ) 該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。

ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド (例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13)、枯草菌由来のプラスミド (例、pUB110, pTP5, pC194)、酵母由来プラスミド (例、pSH19, pSH15)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バキュロウイルスなどの動物ウイルスなどの他、pA1-11、pXT1、pRc/CMV、pRc/RSV、p cDNA I/Neoなどが用いられる。

本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応

して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。例えば、動物細胞を宿主として用いる場合は、SR α プロモーター、SV40プロモーター、LTRプロモーター、CMVプロモーター、HSV-TKプロモーターなどが挙げられる。これらのうち、CMVプロモーター、SR α プロモーターなどを用いるのが好ましい。

宿主がエシェリヒア属菌である場合は、trpプロモーター、lacプロモーター、recAプロモーター、 λ PLプロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が昆虫細胞である場合は、ポリヘドリンプロモーター、P10プロモーターなどが好ましい。

発現ベクターには、以上の他に、所望によりエンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、SV40複製オリジン（以下、SV40oriと略称する場合がある）などを含有しているものを用いることができる。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸還元酵素（以下、dhfrと略称する場合がある）遺伝子〔メソトレキセート（MTX）耐性〕、アンピシリン耐性遺伝子（以下、Amp^rと略称する場合がある）、ネオマイシン耐性遺伝子（以下、Neoと略称する場合がある、G418耐性）等が挙げられる。特に、CHO（dhfr⁻）細胞を用いてdhfr遺伝子を選択マーカーとして使用する場合、目的遺伝子をチミジンを含まない培地によっても選択できる。

また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、本発明のリガンド蛋白質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属菌である場合は、PhoA・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属菌である場合は、 α -アミラーゼ・シグナル配列、サブチリシン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、MF α ・シグナル配列、SUC2・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、インシュリン・シグナル配列、 α -インターフェロン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。

このようにして構築された本発明のリガンド蛋白質をコードするDNAを含有

するベクターを用いて、形質転換体を製造することができる。

宿主としては、例えば、エシェリヒア属菌、バチルス属菌、酵母、昆虫細胞、昆虫、動物細胞などが用いられる。

エシェリヒア属菌の具体例としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) K12・DH1 [プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA), 60巻, 160(1968)], JM103 [ヌクイレック・アシッズ・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9巻, 309(1981)], JA221 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジィ (Journal of Molecular Biology)], 120巻, 517(1978)], HB101 [ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジィ, 41巻, 459(1969)], C600 [ジェネティックス (Genetics), 39巻, 440(1954)] などが用いられる。

バチルス属菌としては、例えば、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) MI114 [ジーン, 24巻, 255(1983)], 207-21 [ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry), 95巻, 87(1984)] などが用いられる。

酵母としては、例えば、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) AH22, AH22R⁻, NA87-11A, DKD-5D, 20B-12、シゾサッカロマイセス ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) NCYC1913, NCYC2036、ピキア パストリス (*Pichia pastoris*) などが用いられる。

昆虫細胞としては、例えば、ウイルスがAcNPVの場合は、夜盗蛾の幼虫由来株化細胞 (*Spodoptera frugiperda* cell; Sf細胞)、*Trichoplusia ni*の中腸由来のMG1細胞、*Trichoplusia ni*の卵由来のHigh FiveTM細胞、*Mamestra brassicae*由来の細胞または*Estigmena acrea*由来の細胞などが用いられる。ウイルスがBmNPVの場合は、蚕由来株化細胞 (*Bombyx mori* N; BmN細胞) などが用いられる。該Sf細胞としては、例えば、Sf9細胞 (ATCC CRL1711)、Sf21細胞 (以上、Vaughn, J.L. ら、イン・ヴィボ (In Vivo), 13, 213-

217, (1977)) などが用いられる。

昆虫としては、例えば、カイコの幼虫などが用いられる〔前田ら、ネイチャー (Nature) , 315巻, 592(1985)] 。

5 動物細胞としては、例えば、サル細胞COS-7, V e r o, チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO細胞と略記), d h f r 遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (以下、CHO (d h f r⁻) 細胞と略記), マウスL細胞, マウスA t T-20, マウスミエローマ細胞, ラットGH3, ヒトFL細胞などが用いられる。

10 エシェリヒア属菌を形質転換するには、例えば、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 69巻, 2110(1972)やジーン (Gene) , 17巻, 107(1982)などに記載の方法に従って行なうことができる。

15 バチルス属菌を形質転換するには、例えば、モレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティックス (Molecular & General Genetics) , 168巻, 111(1979)などに記載の方法に従って行なうことができる。

20 酵母を形質転換するには、例えば、メツソズ・イン・エンザイモロジー (Methods in Enzymology) , 194巻, 182-187 (1991)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユーエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 75巻, 1929(1978)などに記載の方法に従って行なうことができる。

昆虫細胞または昆虫を形質転換するには、例えば、バイオ／テクノロジー (Bio/Technology) , 6, 47-55(1988)) などに記載の方法に従って行なうことができる。

25 動物細胞を形質転換するには、例えば、細胞工学別冊8新細胞工学実験プロトコール, 263-267 (1995) (秀潤社発行)、ヴィロロジー (Virology) , 52巻, 456(1973)に記載の方法に従って行なうことができる。

このようにして、本発明のリガンド蛋白質をコードするDNAを含有する発現

ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。

宿主がエシェリヒア属菌、バチルス属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生育に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、
5 例えば、グルコース、デキストリン、可溶性澱粉、ショ糖など、窒素源としては、
例えば、アンモニウム塩類、硝酸塩類、コーンスチープ・リカー、ペプトン、カゼイン、肉エキス、大豆粕、バレイショ抽出液などの無機または有機物質、無機物としては、例えば、塩化カルシウム、リン酸二水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが挙げられる。また、酵母エキス、ビタミン類、生長促進因子などを添
10 加してもよい。培地のpHは約5～8が望ましい。

エシェリヒア属菌を培養する際の培地としては、例えば、グルコース、カザミノ酸を含むM9培地〔ミラー (Miller) , ジャーナル・オブ・エクスペリメンツ・イン・モレキュラー・ジェネティックス (Journal of Experiments in
15 Molecular Genetics) , 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972〕が好ましい。ここに必要によりプロモーターを効率よく働かせるために、例えば、3β-インドリル アクリル酸のような薬剤を加えることができる。

宿主がエシェリヒア属菌の場合、培養は通常約15～43℃で約3～24時間行ない、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。

20 宿主がバチルス属菌の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。

宿主が酵母である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、バークホルダー (Burkholder) 最小培地 [Bostian, K. L. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 77巻, 4505 (1980)] や0.5%カザミノ酸を含有するSD培地 [Bitter, G. A. ら、「プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ザ・ユエスエー (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) , 81巻, 5330 (1984)] が挙げられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃

～35℃で約24～72時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が昆虫細胞または昆虫である形質転換体を培養する際、培地としては、Grace's Insect Medium (Grace, T.C.C., ネイチャー

(Nature), 195, 788(1962)) に非動化した10%ウシ血清等の添加物を適宜加えたものなどが用いられる。培地のpHは約6.2～6.4に調整するのが好ましい。培養は通常約27℃で約3～5日間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

宿主が動物細胞である形質転換体を培養する際、培地としては、例えば、約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地〔サイエンス (Science), 122巻, 501(1952)], DMEM培地〔ヴィロロジー (Virology), 8巻, 396(1959)], RPMI 1640培地〔ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション (The Journal of the American Medical Association) 199巻, 519(1967)], 199培地〔プロシーディング・オブ・ザ・ソサイエティ・フォー・ザ・バイオロジカル・メディスン (Proceeding of the Society for the Biological Medicine), 73巻, 1(1950)] などが用いられる。pHは約6～8であるのが好ましい。培養は通常約30℃～40℃で約15～60時間行ない、必要に応じて通気や攪拌を加える。

以上のようにして、形質転換体の細胞膜に本発明のリガンド蛋白質またはその部分ペプチドを生成せしめることができる。

上記培養物から本発明のリガンド蛋白質またはその部分ペプチドを分離精製するには、例えば、下記の方法により行なうことができる。

本発明のリガンド蛋白質またはその部分ペプチドを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを適当な緩衝液に懸濁し、超音波、リゾチームおよび／または凍結融解などによって菌体あるいは細胞を破壊したのち、遠心分離やろ過により本発明のリガンド蛋白質またはその部分ペプチドの粗抽出液を得る方法などが適宜用いられる。緩衝液の中に尿素や塩酸グアニジンなどの蛋白質変性剤や、トリトンX-100TMなどの界面活性剤が含まれていてもよい。培養液中に本発明のリガンド蛋白質またはその部分ペプチドが分泌される場合には、培養終了後、それ自体公知の方法で

菌体あるいは細胞と上清とを分離し、上清を集める。

このようにして得られた培養上清、あるいは抽出液中に含まれる本発明のリガンド蛋白質またはその部分ペプチドの精製は、自体公知の分離・精製法を適切に組み合わせて行なうことができる。これらの公知の分離、精製法としては、塩析
5 や溶媒沈殿法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィーなどの荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法
10 などの等電点の差を利用する方法などが用いられる。

かくして得られる本発明のリガンド蛋白質またはその部分ペプチドが遊離体で得られた場合には、自体公知の方法あるいはそれに準じる方法によって塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合には自体公知の方法あるいはそれに準じる方法により、遊離体または他の塩に変換することができる。

15 なお、組換え体が産生する本発明のリガンド蛋白質またはその部分ペプチドを、精製前または精製後に適当な蛋白修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり、ポリペプチドを部分的に除去することもできる。蛋白修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、アルギニルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グリコシダーゼなどが用いられる。

20 かくして生成する本発明のリガンド蛋白質またはその塩、本発明の部分ペプチドもしくはそのエステルもしくはそのアミドまたはその塩の活性は、標識したレ

~~ポーターの結合実験に用いることができる。また、本発明のリガンド蛋白質またはその塩、本発明の部分ペプチドもしくはそのエステルもしくはそのアミドまたはその塩の活性は、標識したレ~~

〔モノクローナル抗体の作製〕

(a) モノクローナル抗体産生細胞の作製

本発明のリガンド蛋白質に対するレセプター（以下「レセプター」という場合もある）は、哺乳動物に対して投与することにより抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常2～6週毎に1回ずつ、計2～10回程度行なわれる。用いられる哺乳動物としては、例えば、サル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギなどがあげられるが、マウスおよびラットが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えば、マウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の2～5日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髄腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば、後記の標識化された本発明のリガンド蛋白質とを反応させたのち、抗体に結合した標識剤の活性を測定することにより行なうことができる。融合操作は既知の方法、例えば、ケーラーとミルスタインの方法〔ネイチャー (Nature)、256巻、495頁 (1975年)〕に従い実施することができる。融合促進剤としては、例えば、ポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウィルスなどが挙げられるが、好ましくはPEGが用いられる。

骨髄腫細胞としては、例えば、NS-1、P3U1、SP2/0などが挙げられるが、P3U1が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞（脾臓細胞）数と骨髄腫細胞数との好ましい比率は1：1～20：1程度であり、PEG（好ましくは、PEG1000～PEG6000）が10～80%程度の濃度で添加され、約20～40℃、好ましくは約30～37℃で約1～10分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えば、本発明のリガンド蛋白質抗原を直接あるいは担体とともに

吸着させた固相（例、マイクロプレート）にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体（細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体が用いられる）またはプロテインAを加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体またはプロテインAを吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識した本発明のリガンド蛋白質を加え、固相に結合したモノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

モノクローナル抗体の選別は、自体公知あるいはそれに準じる方法に従って行なうことができるが、通常はHAT（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン）を添加した動物細胞用培地などで行なうことができる。選別および育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いても良い。例えば、1～20%、好ましくは10～20%の牛胎児血清を含むRPMI 1640培地、1～10%の牛胎児血清を含むGIT培地（和光純薬工業（株））またはハイブリドーマ培養用無血清培地（SFM-101、日水製薬（株））などを用いることができる。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは約37℃である。培養時間は、通常5日～3週間、好ましくは1週間～2週間である。培養は、通常5%炭酸ガス下で行なうことができる。ハイブリドーマ培養上清の抗体価は、上記の抗血清中の抗体価の測定と同様に測定できる。

（b）モノクローナル抗体の精製

モノクローナル抗体の分離精製は、通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法〔例、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例、DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲルろ過法、抗原結合固相またはプロテインAあるいはプロテインGなどの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法〕に従って行なうことができる。

〔ポリクローナル抗体の作製〕

本発明のポリクローナル抗体は、それ自体公知あるいはそれに準じる方法にしたがって製造することができる。例えば、免疫抗原（リガンド蛋白質抗原）とキャリアー蛋白質との複合体をつくり、上記のモノクローナル抗体の製造法と同様

に哺乳動物に免疫を行ない、該免疫動物から本発明のリガンド蛋白質またはレセプター蛋白質に対する抗体含有物を採取して、抗体の分離精製を行なうことにより製造できる。

5 哺乳動物を免疫するために用いられる免疫抗原とキャリアー蛋白質との複合体に関し、キャリアー蛋白質の種類およびキャリアーとハプテンとの混合比は、キャリアーに架橋させて免疫したハプテンに対して抗体が効率良くできれば、どのようなものをどのような比率で架橋させてもよいが、例えば、ウシ血清アルブミン、ウシサイログロブリン、キーホール・リンペット・ヘモシアニン等を重量比でハプテン1に対し、約0.1～20、好ましくは約1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリアーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることができるが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド、マレイミド活性エステル、チオール基、ジチオビリジル基を含有する活性エステル試薬等が用いられる。

15 縮合生成物は、温血動物に対して、抗体産生が可能な部位にそれ自体あるいは担体、希釈剤とともに投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は、通常約2～6週毎に1回ずつ、計約3～10回程度行なうことができる。

ポリクローナル抗体は、上記の方法で免疫された哺乳動物の血液、腹水など、好ましくは血液から採取することができる。

20 抗血清中のポリクローナル抗体価の測定は、上記の血清中の抗体価の測定と同様にして測定できる。ポリクローナル抗体の分離精製は、上記のモノクローナル抗体の分離精製と同様の免疫グロブリンの分離精製法に従って行なうことができる。

25 本発明のリガンド蛋白質またはその塩、その部分ペプチドもしくはそのエステルもしくはそのアミドまたはその塩、およびそれをコードするDNAは、(1) 本発明のリガンド蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および/または治療剤、(2) 遺伝子診断剤、(3) 本発明のリガンド蛋白質に対するレセプターの定量、(4) 本発明のリガンド蛋白質とレセプターとの結合性を変化させる化合物(アゴニスト、アンタゴニストなど)のスクリーニング、(5) 本発明のリガンド蛋

白質とレセプターとの結合性を変化させる化合物（アゴニスト、アンタゴニスト）を含有する各種疾病の予防および／または治療剤、（６）本発明のリガンド蛋白質の定量、（７）本発明のリガンド蛋白質に対する抗体による中和、（８）本発明のリガンド蛋白質をコードするDNAを有する非ヒト動物の作製などに用

5 いることができる。

特に、本発明の組換え型リガンド蛋白質の発現系を用いた、後述のレセプターとの結合アッセイ系を用いることによって、ヒトや哺乳動物に特異的な本発明のリガンド蛋白質に対するレセプターの結合性を変化させる化合物（例、アゴニスト、アンタゴニストなど）をスクリーニングすることができ、該アゴニストまたはアンタゴニストを後述の各種疾病の予防・治療剤などとして使用することができる。

10

本発明のリガンド蛋白質、およびそれをコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）および本発明のリガンド蛋白質に対する抗体（以下、本発明の抗体と略記する場合がある）等の用途について、以下に具体的に説明する。

15

（１）本発明のリガンド蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤

本発明のリガンド蛋白質または該リガンド蛋白質をコードするDNAを、本発明のリガンド蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤などの医薬として使用することができる。

20

例えば、生体内において本発明のリガンド蛋白質が減少しているためにレセプターの生理作用が期待できない（該リガンド蛋白質の欠乏症）患者がいる場合に、①本発明のリガンド蛋白質を該患者に投与し該リガンド蛋白質の量を補充したり、②（イ）本発明のリガンド蛋白質をコードするDNAを該患者に投与し発現させることによって、あるいは（ロ）対象となる細胞に本発明のリガンド蛋白質をコードするDNAを挿入し発現させた後に、該細胞を該患者に移植することなどによって、患者の体内における本発明のリガンド蛋白質の量を増加させ、それに対するレセプターの作用を充分に発揮させることができる。したがって、本発明のリガンド蛋白質および本発明のリガンド蛋白質をコードするDNAは、安全で低

25

毒性な本発明のリガンド蛋白質の機能不全に関連する疾患の予防および／または治療剤などの医薬として有用である。

5 本発明のリガンド蛋白質および本発明のリガンド蛋白質をコードするDNAは、癌転移抑制活性を有するため、あらゆる癌（例えば、肺癌、胃癌、肝癌、膀胱癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、乳癌等）の予防または治療薬に有用である。

また、レセプター蛋白質に対するアゴニストは、胎盤機能調節作用を有するため、絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の發育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防または治療薬に有用である。

10 本発明のリガンド蛋白質を上記予防・治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

一方、本発明のリガンド蛋白質をコードするDNA（以下、本発明のDNAと略記する場合がある）を上記予防・治療剤として使用する場合は、本発明のDNAを単独あるいはレトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノウイルスアソシエーテッドウイルスベクターなどの適当なベクターに挿入した後、
15 常套手段に従って実施することができる。本発明のDNAは、そのまま、あるいは摂取促進のための補助剤とともに、遺伝子銃やハイドロゲルカテーテルのようなカテーテルによって投与できる。

例えば、①本発明のリガンド蛋白質または②該リガンド蛋白質をコードするDNAは、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、①本発明のリガンド蛋白質または②該リガンド蛋白質をコードするDNAを生理学的に認められる公知の担体、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、
20 安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロ

ースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤などが用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールなど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

本発明のリガンド蛋白質の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60kgとして）におい

ては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

- 5 本発明のリガンド蛋白質をコードするDNAの投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.1mg～100mg、好ましくは約1.0～50mg、より好ましくは約1.0～20mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法
- 10 などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60kgとして）においては、一日につき約0.01～30mg程度、好ましくは約0.1～20mg程度、より好ましくは約0.1～10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60kgあたりに換算した量を投与することができる。

15 (2) 遺伝子診断剤

- 本発明のリガンド蛋白質をコードするDNAまたはレセプター蛋白質をコードするDNAは、プローブとして使用することにより、ヒトまたは哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）における本発明のリガンド蛋白質をコードするDNAまたはmRNAの異常（遺伝子異常）を検出することができるので、例えば、該DNAまたはmRNAの損傷、
- 20 突然変異あるいは発現低下や、該DNAまたはmRNAの増加あるいは発現過多などの遺伝子診断剤として有用である。

- 本発明のリガンド蛋白質をコードするDNAを用いる上記の遺伝子診断は、例えば、自体公知のノーザンハイブリダイゼーションやPCR-SSCP法（ゲノミックス (Genomics) , 第5巻, 874～879頁 (1989年)、プロシーディングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンシズ・オブ・ユ
- 25 ーエスエー (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) , 第86巻, 2766～2770頁 (1989年)) などにより実施することができる。

(3) 本発明のリガンド蛋白質に対するレセプターの定量法

レセプター蛋白質は、本発明のリガンド蛋白質に対して結合性を有しているので、生体内におけるレセプター濃度を感度良く定量することができる。

5 本発明の定量法は、例えば、競合法と組み合わせることによって用いることができる。すなわち、被検体を本発明のリガンド蛋白質と接触させることによって被検体中のレセプター濃度を測定することができる。具体的には、例えば、以下の①または②などに記載の方法あるいはそれに準じる方法に従って用いることができる。

①入江寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)

10 ②入江寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)

(4) 本発明のリガンド蛋白質またはその塩とレセプターとの結合性を变化させる化合物(アゴニスト、アンタゴニストなど)のスクリーニング方法

15 本発明のリガンド蛋白質に対するレセプター蛋白質またはその塩を用いるか、または組換え型レセプター蛋白質の発現系を構築し、該発現系を用いたレセプター結合アッセイ系を用いることによって、本発明のリガンド蛋白質とレセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物(例えば、ペプチド、蛋白質、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物など)またはその塩を効率よくスクリーニングすることができる。ここで使用するレセプターとしては、性質等が十分に知られているもの、例えばG蛋白質共役型レセプター蛋白質、特にヒト、マウスまたは
20 ラットのOT7T175等が好ましい。

このような化合物には、(イ)例えば、G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下など
25 を促進する活性または抑制する活性など)を有する化合物(いわゆる、レセプター蛋白質に対するアゴニスト)、(ロ)該細胞刺激活性を有しない化合物(いわゆる、レセプター蛋白質に対するアンタゴニスト)、あるいは(ハ)本発明のリガンド蛋白質とレセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物などが含まれる。

すなわち、本発明は、(i)本発明のリガンド蛋白質と本発明のレセプター蛋

白質とを接触させた場合と (ii) 本発明のリガンド蛋白質および試験化合物とレセプター蛋白質とを接触させた場合との比較を行なうことを特徴とする本発明のリガンド蛋白質とレセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供する。

- 5 本発明のスクリーニング方法においては、(i) と (ii) の場合における、例えば、本発明のリガンド蛋白質に対するレセプターの結合量、細胞刺激活性などを測定して、比較することを特徴とする。

より具体的には、本発明は、

- 10 ①標識した本発明のリガンド蛋白質を、レセプター蛋白質に接触させた場合と、
標識した本発明のリガンド蛋白質および試験化合物をレセプター蛋白質に接触させた場合における、標識した本発明のリガンド蛋白質の該レセプター蛋白質に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のリガンド蛋白質とレセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法（この場合、リガンドではなくレセプターを標識してもよい）、
- 15 ②標識した本発明のリガンド蛋白質を、レセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合と、標識した本発明のリガンド蛋白質および試験化合物をレセプター蛋白質を含有する細胞または該細胞の膜面分に接触させた場合における、標識した本発明のリガンド蛋白質の該細胞または該膜面分に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のリガンド蛋白質とレセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- 20 ③標識した本発明のリガンド蛋白質を、本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合と、
標識した本発明のリガンド蛋白質および試験化合物を本発明のDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触
- 25 させた場合における、標識した本発明のリガンド蛋白質の該レセプター蛋白質等に対する結合量を測定し、比較することを特徴とする本発明のリガンド蛋白質とレセプター蛋白質との結合性を变化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、
- ④本発明のリガンド蛋白質をレセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合

と、本発明のリガンド蛋白質をおよび試験化合物をレセプター蛋白質を含有する細胞に接触させた場合における、レセプターを介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする本発明のリガンド蛋白質と本発明のレセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

⑤本発明のリガンド蛋白質をレセプターDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合と、本発明のリガンド蛋白質および試験化合物をレセプターDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したレセプター蛋白質に接触させた場合における、レセプターを介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定し、比較することを特徴とする本発明のリガンド蛋白質とレセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法などを提供する。

上記①～⑤いずれかの方法を用いることによって、リガンドとG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がアゴニストかアンタゴニストかを簡便に評価することができる。

本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。

まず、本発明のスクリーニング方法に用いるレセプター蛋白質としては、前記したレセプター蛋白質を含有するものであれば何れのものであってもよいが、レセプター蛋白質を含有する哺乳動物の臓器の細胞膜面分が好適である。しかし、スクリーニングに用いる大量のレセプター蛋白質を得るには、組換え体を用いて大量発現させたレセプター蛋白質などが適している。

レセプター蛋白質を製造するには、前述の方法が用いられるが、そのDNAを

哺乳細胞や昆虫細胞で発現することにより行なうことが好ましい。目的とする蛋白質部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。

レセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効

5 率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス (nuclear polyhedrosis virus ; NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SR α プロモーターなどの下流に組み込むのが

10 好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 [Nambi, P. ら、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.) , 267巻, 19555~19559頁, 1992年] に記載の方法に従って行なうことができる。

したがって、本発明のスクリーニング方法において、レセプター蛋白質を含有

15 するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したレセプター蛋白質であってもよいし、該レセプター蛋白質を含有する細胞を用いてもよく、また該レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。

本発明のスクリーニング方法において、レセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタルアルデヒド、ホルマリンなどで固定化してもよい。

20 固定化方法はそれ自体公知の方法に従って行なうことができる。

レセプター蛋白質を含有する細胞としては、該レセプター蛋白質を発現した宿主細胞をいうが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが好ましい。

細胞膜画分としては、細胞を破碎した後、それ自体公知の方法で得られる細胞

25 膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破碎方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematica社製) のよる破碎、超音波による破碎、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破碎などが挙げられる。細胞膜の分画には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力によ

る分画法が主として用いられる。例えば、細胞破碎液を低速（500rpm～3000rpm）で短時間（通常、約1分～10分）遠心し、上清をさらに高速（15000rpm～30000rpm）で通常30分～2時間遠心し、得られる沈澱を膜画分とする。該膜画分中には、発現したレセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

該レセプター蛋白質を含有する細胞や膜画分中のレセプター蛋白質の量は、1細胞当たり 10^3 ～ 10^8 分子であるのが好ましく、 10^5 ～ 10^7 分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性（比活性）が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようになる。

本発明のリガンド蛋白質とレセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物をスクリーニングする前記の①～③を実施するためには、例えば、適当なレセプター蛋白質画分と、標識したリガンドが必要である。

レセプター蛋白質画分としては、天然型のレセプター蛋白質画分か、またはそれと同等の活性を有する組換え型レセプター蛋白質画分などが望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性、シグナル情報伝達作用などを示す。

標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアナログ化合物などが用いられる。例えば $[^3\text{H}]$ 、 $[^{125}\text{I}]$ 、 $[^{14}\text{C}]$ 、 $[^{35}\text{S}]$ などで標識されたリガンド（本発明のリガンド蛋白質）などが用いられる。

具体的には、本発明のリガンド蛋白質とレセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物のスクリーニングを行なうには、まずレセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター蛋白質標品を調製する。バッファーには、pH4～10（望ましくはpH6～8）のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80TM

（花王-アトラス社）、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターや本発明のリガンド蛋白質の分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64（ペ

ブチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することでもできる。0.01ml~10mlの該レセプター溶液に、一定量(5000cpm~500000cpm)の標識した本発明のリガンド蛋白質を添加し、同時に 10^{-4}M ~ 10^{-10}M の試験化合物を共存させる。非特異的結合量(NSB)を知るために大過剰の未標識の本発明のリガンド蛋白質を加えた反応チューブも用意する。反応は約0℃から50℃、望ましくは約4℃から37℃で、約20分から24時間、望ましくは約30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に残存する放射活性を液体シンチレーションカウンターまたはγ-カウンターで計測する。拮抗する物質がない場合のカウント(B_0)から非特異的結合量(NSB)を引いたカウント($B_0 - \text{NSB}$)を100%とした時、特異的結合量($B - \text{NSB}$)が、例えば、50%以下になる試験化合物を拮抗阻害能力のある候補物質として選択することができる。

本発明のリガンド蛋白質とレセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物スクリーニングする前記の④~⑤の方法を実施するためには、例えば、レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性(例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。

具体的には、まず、レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。スクリーニングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質(例えば、アラキドン酸など)の生成が、細胞が含有する分解酵素によって検定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォルスコリンなどで細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出することがで

きる。

細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なレセプター蛋白質を発現した細胞が必要である。レセプター蛋白質を発現した細胞としては、天然型のレセプター蛋白質を有する細胞株、前述の組換え型レセプター蛋白質を発現した細胞株などが望ましい。

試験化合物としては、例えば、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液などが用いられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

本発明のリガンド蛋白質とレセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用キットは、レセプター蛋白質、レセプター蛋白質を含有する細胞、またはレセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有するものなどである。

本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、0.05%のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。

孔径0.45 μ mフィルターで濾過滅菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製しても良い。

②G蛋白質共役型レセプター標品

レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに $\times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5%CO₂、95%airで2日間培養したもの。

③標識リガンド

市販の [³H]、[¹²⁵I]、[¹⁴C]、[³⁵S]などで標識した本発明のリガンド蛋白質

水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1 μ Mに希釈する。

④リガンド標準液

本発明のリガンド蛋白質を0.1%ウシ血清アルブミン（シグマ社製）を含むPBSで1mMとなるように溶解し、-20℃で保存する。

2. 測定法

- ① 12穴組織培養用プレートにて培養したレセプター蛋白質発現CHO細胞を、
5 測定用緩衝液1mlで2回洗浄した後、490 μ lの測定用緩衝液を各穴に加える。
- ② $10^{-3} \sim 10^{-10}$ Mの試験化合物溶液を5 \cdot 洗浄した後、標識リガンドを5 μ l加え、室温にて1時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の代わりに 10^{-3} Mのリガンドを5 μ l加えておく。
- 10 ③ 反応液を除去し、1mlの洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1%SDSで溶解し、4mlの液体シンチレーターA（和光純薬製）と混合する。
- ④ 液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding（PMB）を次の式〔数1〕で求める。

15

〔数1〕

$$\text{PMB} = [(B - \text{NSB}) / (B_0 - \text{NSB})] \times 100$$

PMB : Percent Maximum Binding

B : 検体を加えた時の値

20 NSB : Non-specific Binding（非特異的結合量）

B₀ : 最大結合量

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られうる化合物またはその塩は、本発明のリガンド蛋白質とレセプター蛋白質との結合性を
25 変化させる作用を有する化合物であり、具体的には、（イ）G蛋白質共役型レセプターを介して細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca²⁺遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を有する化合物

(いわゆる、レセプター蛋白質に対するアゴニスト)、(ロ)該細胞刺激活性を有しない化合物(いわゆる、レセプター蛋白質に対するアンタゴニスト)、あるいは(ハ)本発明のリガンド蛋白質とレセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物である。

- 5 該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプチド性化合物、合成化合物、発酵生産物などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。

レセプター蛋白質に対するアゴニストは、レセプター蛋白質に対する本発明のリガンド蛋白質が有する生理活性と同様の作用を有しているため、該リガンド活性に応じて安全で低毒性な医薬として有用である。

10

具体的には、レセプター蛋白質に対するアゴニストは癌転移抑制活性を有するため、あらゆる癌(例えば、肺癌、胃癌、肝癌、膵癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、乳癌等)の予防または治療薬に有用である。

また、レセプター蛋白質に対するアゴニストは、胎盤機能調節作用を有するため、絨毛癌、胎状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防または治療薬に有用である。

15

レセプター蛋白質に対するアンタゴニストは、レセプター蛋白質に対する本発明のリガンド蛋白質が有する生理活性を抑制することができるため、該リガンド活性を抑制する安全で低毒性な医薬として有用である。

- 20 本発明のリガンド蛋白質とレセプター蛋白質との結合力を減少させる化合物は、レセプター蛋白質に対する本発明のリガンド蛋白質が有する生理活性を減少させるための安全で低毒性な医薬として有用である。

本発明のスクリーニング方法またはスクリーニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。例えば、前記した本発明のDNAを含有する医薬と同様に、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤、無菌性溶液、懸濁液剤などとする事ができる。

25

このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるため、例えば、ヒトや哺乳動物(例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サ

ルなど) に対して投与することができる。

該化合物またはその塩 (アゴニストの場合) の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者 (60 kg として) においては、一日につき約 0.1 ~ 100 mg、好ましくは約 1.0 ~ 50 mg、より好ましくは約 1.0 ~ 20 mg である。非経口的に投与する場合は、その 1 回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者 (60 kg として) においては、一日につき約 0.01 ~ 30 mg 程度、好ましくは約 0.1 ~ 20 mg 程度、より好ましくは約 0.1 ~ 10 mg 程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg 当りに換算した量を投与することができる。

(5) 本発明のリガンド蛋白質とレセプターとの結合性を变化させる化合物 (アゴニスト、アンタゴニスト) を含有する各種疾病の予防および/または治療剤

本発明のリガンド蛋白質は前述のとおり、癌転移抑制活性を有するため、あらゆる癌 (例えば、肺癌、胃癌、肝癌、膀胱癌、大腸癌、直腸癌、結腸癌、前立腺癌、卵巣癌、子宮頸癌、乳癌等) の予防または治療薬に有用である。

また、レセプター蛋白質に対するアゴニストは、胎盤機能調節作用を有するため、絨毛癌、胞状奇胎、侵入奇胎、流産、胎児の発育不全、糖代謝異常、脂質代謝異常または分娩誘発の予防または治療薬に有用である。従って、本発明のリガンド蛋白質とレセプターとの結合性を变化させる化合物 (アゴニスト、アンタゴニスト) は、本発明のリガンド蛋白質の機能不全または不足もしくは過剰に関連する疾患の予防および/または治療剤として用いることができる。

該化合物を本発明のリガンド蛋白質の機能不全または不足もしくは過剰に関連する疾患の予防および/または治療剤として使用する場合は、常套手段に従って製剤化することができる。

例えば、該化合物は、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、該化合物を生理学的に認められる公知の担体、香味

剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製剤実施に要求される単位用量形態で混和することによって製造することができる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

- 5 錠剤、カプセル剤などに混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガント、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸などのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油またはチェリーのような香味剤など
- 10 が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、前記タイプの材料にさらに油脂のような液状担体を含むことができる。注射のための無菌組成物は注射用水のようなベヒクル中の活性物質、胡麻油、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施に従って処方することができる。注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の
- 15 補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などが用いられ、適当な溶解補助剤、例えば、アルコール（例、エタノール）、ポリアルコール（例、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤（例、ポリソルベート80（TM）、HCO-50）などと併用してもよい。油性液としては、例えば、ゴマ油、大豆油などが用
- 20 いられ、溶解補助剤である安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどと併用してもよい。

- また、上記予防・治療剤は、例えば、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカインなど）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン、ポリエチレングリコールな
- 25 ど）、保存剤（例えば、ベンジルアルコール、フェノールなど）、酸化防止剤などと配合してもよい。調整された注射液は通常、適当なアンプルに充填される。

 このようにして得られる製剤は安全で低毒性であるので、例えば、ヒトや哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ウサギ、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）に対して投与することができる。

該化合物またはその塩の投与量は、投与対象、対象臓器、症状、投与方法などにより差異はあるが、経口投与の場合、一般的に例えば、癌患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.1～100 mg、好ましくは約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20 mgである。非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法などによっても異なるが、例えば、注射剤の形では通常例えば、癌患者（60 kgとして）においては、一日につき約0.01～30 mg程度、好ましくは約0.1～20 mg程度、より好ましくは約0.1～10 mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、60 kg当りに換算した量を投与することができる。

10 (6) 本発明のリガンド蛋白質の定量

本発明のリガンド蛋白質またはレセプターに対する抗体は、本発明のリガンド蛋白質またはレセプターを特異的に認識することができるので、被検液中の本発明のリガンド蛋白質またはレセプターの定量、特にサンドイッチ免疫測定法による定量などに使用することができる。すなわち、本発明は、例えば、(i) 本発明のリガンド蛋白質またはレセプターに対する抗体と、被検液および標識化リガンド蛋白質またはレセプターとを競合的に反応させ、該抗体に結合した標識化リガンド蛋白質またはレセプターの割合を測定することを特徴とする被検液中の本発明のリガンド蛋白質またはレセプターの定量法、

20 (ii) 被検液と担体上に不溶化した本発明のリガンド蛋白質またはレセプターに対する抗体および標識化された本発明のリガンド蛋白質またはレセプターに対する抗体とを同時あるいは連続的に反応させたのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することを特徴とする被検液中の本発明のリガンド蛋白質またはレセプターの定量法を提供する。

25 上記(ii)においては、一方の抗体が本発明のリガンド蛋白質またはレセプターのN端部を認識する抗体で、他方の抗体が本発明のリガンド蛋白質またはレセプターC端部に反応する抗体であることが好ましい。

本発明のリガンド蛋白質またはレセプターに対するモノクローナル抗体（以下、本発明のモノクローナル抗体と称する場合がある）を用いて本発明のリガンド蛋白質またはレセプターの測定を行なえるほか、組織染色等による検出を行なうこ

ともできる。これらの目的には、抗体分子そのものを用いてもよく、また、抗体分子の $F(a b')_2$ 、 $F a b'$ 、あるいは $F a b$ 画分を用いてもよい。本発明のリガンド蛋白質またはレセプターに対する抗体を用いる測定法は、特に制限されるべきものではなく、被測定液中の抗原量（例えば、リガンド蛋白質量またはレセプター）に対応した抗体、抗原もしくは抗体-抗原複合体の量を化学的または物理的手段により検出し、これを既知量の抗原を含む標準液を用いて作製した標準曲線より算出する測定法であれば、いずれの測定法を用いてもよい。例えば、ネフロメトリー、競合法、イムノメトリック法およびサンドイッチ法が好適に用いられるが、感度、特異性の点で、後述するサンドイッチ法を用いるのが特に好ましい。

標識物質を用いる測定法に用いられる標識剤としては、例えば、放射性同位元素、酵素、蛍光物質、発光物質などが用いられる。放射性同位元素としては、例えば、 $[^{125}I]$ 、 $[^{131}I]$ 、 $[^3H]$ 、 $[^{14}C]$ などが用いられる。上記酵素としては、安定で比活性の大きなものが好ましく、例えば、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、パーオキシダーゼ、リンゴ酸脱水素酵素などが用いられる。蛍光物質としては、例えば、フルオレスカミン、フルオレッセンイソチオシアネートなどが用いられる。発光物質としては、例えば、ルミノール、ルミノール誘導体、ルシフェリン、ルシゲニンなどが用いられる。さらに、抗体あるいは抗原と標識剤との結合にビオチン-アビジン系を用いることもできる。

抗原あるいは抗体の不溶化に当っては、物理吸着を用いてもよく、また通常、蛋白質あるいは酵素等を不溶化、固定化するのに用いられる化学結合を用いる方法でもよい。担体としては、例えば、アガロース、デキストラン、セルロースなどの不溶性多糖類、ポリスチレン、ポリアクリルアミド、シリコン等の合成樹脂、あるいはガラス等が用いられる。

サンドイッチ法においては不溶化した本発明のモノクローナル抗体に被検液を反応させ（１次反応）、さらに標識化した本発明のモノクローナル抗体を反応させ（２次反応）たのち、不溶化担体上の標識剤の活性を測定することにより被検液中の本発明のリガンド蛋白質量またはレセプターを定量することができる。 1

次反応と2次反応は逆の順序に行なっても、また、同時に行なってもよいし時間をずらして行なってもよい。標識化剤および不溶化の方法は前記のそれらに準じることができる。

また、サンドイッチ法による免疫測定法において、固相用抗体あるいは標識用
5 抗体に用いられる抗体は必ずしも1種類である必要はなく、測定感度を向上させる等の目的で2種類以上の抗体の混合物を用いてもよい。

本発明のサンドイッチ法によるリガンド蛋白質またはレセプターの測定法においては、1次反応と2次反応に用いられる本発明のモノクローナル抗体はリガンド蛋白質の結合する部位が相異なる抗体が好ましく用いられる。即ち、1次反応
10 および2次反応に用いられる抗体は、例えば、2次反応で用いられる抗体が、リガンド蛋白質のC端部を認識する場合、1次反応で用いられる抗体は、好ましくはC端部以外、例えばN端部を認識する抗体が用いられる。

本発明のリガンド蛋白質またはレセプターに対するモノクローナル抗体をサンドイッチ法以外の測定システム、例えば、競合法、イムノメトリック法あるいは
15 ネフロメトリーなどに用いることができる。競合法では、被検液中の抗原と標識抗原とを抗体に対して競合的に反応させたのち、未反応の標識抗原と(F)と抗体と結合した標識抗原(B)とを分離し(B/F分離)、B、Fいずれかの標識量を測定し、被検液中の抗原量を定量する。本反応法には、抗体として可溶性抗体を用い、B/F分離をポリエチレングリコール、前記抗体に対する第2抗体など
20 を用いる液相法、および、第1抗体として固相化抗体を用いるか、あるいは、第1抗体は可溶性のものを用地第2抗体として固相化抗体を用いる固相化法とが用いられる。

イムノメトリック法では、被検液中の抗原と固相化抗原とを一定量の標識化抗体に対して競合反応させた後固相と液相を分離するか、あるいは、被検液中の抗原と過剰量の標識化抗体とを反応させ、次に固相化抗原を加え未反応の標識化抗体を固相に結合させたのち、固相と液相を分離する。次に、いずれかの相の標識
25 量を測定し被検液中の抗原量を定量する。

また、ネフロメトリーでは、ゲル内あるいは溶液中で抗原抗体反応の結果、生じた不溶性の沈降物の量を測定する。被検液中の抗原量が僅かであり、少量の沈

降物しか得られない場合にもレーザーの散乱を利用するレーザーネフロメトリーなどが好適に用いられる。

これら個々の免疫学的測定法を本発明の測定方法に適用するにあたっては、特別の条件、操作等の設定は必要とされない。それぞれの方法における通常の条件、
5 操作法に当業者の通常の技術的配慮を加えて本発明のリガンド蛋白質またはレセプターの測定系を構築すればよい。これらの一般的な技術手段の詳細については、総説、成書などを参照することができる〔例えば、入江 寛編「ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和49年発行)、入江 寛編「続ラジオイムノアッセイ」(講談社、昭和54年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(医学書院、昭和53年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第2版)(医学書院、昭和57年発行)、石川栄治ら編「酵素免疫測定法」(第3版)(医学書院、昭和62年発行)、「メソッズ・イン・エンジモロジー (Methods in ENZYMOLOGY)」Vol. 70(Immunochemical Techniques(Part A))、同書 Vol. 73(Immunochemical Techniques(Part B))、同書 Vol. 74(Immunochemical Techniques(Part C))、
10 同書 Vol. 84(Immunochemical Techniques(Part D:Selected Immunoassays))、同書 Vol. 92(Immunochemical Techniques(Part E:Monoclonal Antibodies and General Immunoassay Methods))、同書 Vol. 121(Immunochemical Techniques(Part I:Hybridoma Technology and Monoclonal Antibodies)) (以上、アカデミックプレス社発行)など参照〕。

20 以上のように、本発明の抗体を用いることによって、本発明のリガンド蛋白質またはレセプターを感度良く定量することができる。

さらに、本発明の抗体を用いて、生体内での本発明のリガンド蛋白質またはレセプターを定量することによって、本発明のリガンド蛋白質の機能不全に関連する各種疾患の診断をすることができる。

25 また、本発明のリガンド蛋白質またはレセプターに対する抗体は、体液や組織などの被検体中に存在する本発明のリガンド蛋白質またはレセプターを特異的に検出するために使用することができる。また、本発明のリガンド蛋白質またはレセプターを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中の本発明のリガンド蛋白質の検出、被検細胞内における本発明のリガンド蛋白質または

レセプターの挙動の分析などのために使用することができる。

(7) 本発明のリガンド蛋白質に対する抗体による中和

5 本発明のリガンド蛋白質またはレセプターに対する抗体の、それらリガンド蛋白質または該レセプターに対する中和活性とは、即ち、該リガンド蛋白質または該レセプターの関与するシグナル伝達機能を不活性化する活性を意味する。従って、該抗体が中和活性を有する場合は、該リガンド蛋白質または該レセプターの関与するシグナル伝達、例えば、該リガンド蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内 Ca^{2+} 遊離、細胞内 cAMP 生成、細胞内 cGMP 生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fos の活性化、pH の低下などを促進する活性または抑制する活性など）を不活性化することができる。従って、該リガンド蛋白質または該レセプターの過剰発現などに起因する疾患の予防および／または治療に用いることができる。

(8) 本発明のリガンド蛋白質をコードする DNA を有する動物の作製

15 本発明の DNA を用いて、本発明のリガンド蛋白質を発現するトランスジェニック動物を作製することができる。動物としては、哺乳動物（例えば、ラット、マウス、ラット、ヒツジ、ブタ、ウシ、ネコ、イヌ、サルなど）などが挙げられるが、特に、マウス、ウサギなどが好適である。

20 本発明の DNA を対象動物に転移させるにあたっては、該 DNA を動物細胞で発現させうるプロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトとして用いるのが一般に有利である。例えば、マウス由来の本発明の DNA を転移させる場合、これと相同性が高い動物由来の本発明の DNA を動物細胞で発現させうる各種プロモーターの下流に結合した遺伝子コンストラクトを、例えば、マウス受精卵へマイクロインジェクションすることによって本発明のレセプター蛋白質を高産生する DNA 転移動動物を作出できる。このプロモーターとしては、例えば、ウイルス由来プロモーター、メタロチオネイン等のユビキアスな発現プロモーターも使用しうるが、好ましくは脳で特異的に発現する NGF 遺伝子プロモーターやエノラーゼ遺伝子プロモーターなどが用いられる。

25 受精卵細胞段階における本発明の DNA の転移は、対象動物の胚芽細胞および

体細胞の全てに存在するように確保される。DNA転移後の作出動物の胚芽細胞において本発明のリガンド蛋白質が存在することは、作出動物の子孫が全てその胚芽細胞及び体細胞の全てに本発明のリガンド蛋白質を有することを意味する。遺伝子を受け継いだこの種の動物の子孫はその胚芽細胞および体細胞の全てに本発明のリガンド蛋白質を有する。

5 本発明のDNA転移動物は、交配により遺伝子を安定に保持することを確認して、該DNA保有動物として通常の飼育環境で飼育継代を行うことができる。さらに、目的DNAを保有する雌雄の動物を交配することにより、導入遺伝子を相同染色体の両方に持つホモザイゴート動物を取得し、この雌雄の動物を交配することによりすべての子孫が該DNAを有するように繁殖継代することができる。

10 本発明のDNAが転移された動物は、本発明のリガンド蛋白質が高発現させられているので、本発明のリガンド蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング用の動物などとして有用である。

15 本発明のDNA転移動物を、組織培養のための細胞源として使用することもできる。例えば、本発明のDNA転移マウスの組織中のDNAもしくはRNAを直接分析するか、あるいは遺伝子により発現された本発明のリガンド蛋白質が存在する組織を分析することにより、本発明のリガンド蛋白質について分析することができる。本発明のリガンド蛋白質を有する組織の細胞を標準組織培養技術により培養し、これらを使用して、例えば、脳や末梢組織由来のような一般に培養困難な組織からの細胞の機能を研究することができる。また、その細胞を用いることにより、例えば、各種組織の機能を高めるような医薬の選択も可能である。また、高発現細胞株があれば、そこから、本発明のリガンド蛋白質を単離精製することも可能である。

25 本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。

| | | |
|----|------|-----------------|
| | DNA | : デオキシリボ核酸 |
| | cDNA | : 相補的デオキシリボ核酸 |
| | A | : アデニン |
| | T | : チミン |
| 5 | G | : グアニン |
| | C | : シトシン |
| | RNA | : リボ核酸 |
| | mRNA | : メッセンジャーリボ核酸 |
| | dATP | : デオキシアデノシン三リン酸 |
| 10 | dTTP | : デオキシチミジン三リン酸 |
| | dGTP | : デオキシグアノシン三リン酸 |
| | dCTP | : デオキシシチジン三リン酸 |
| | ATP | : アデノシン三リン酸 |
| | EDTA | : エチレンジアミン四酢酸 |
| 15 | SDS | : ドデシル硫酸ナトリウム |
| | Gly | : グリシン |
| | Ala | : アラニン |
| | Val | : バリン |
| | Leu | : ロイシン |
| 20 | Ile | : イソロイシン |
| | Ser | : セリン |
| | Thr | : スレオニン |
| | Cys | : システイン |
| | Met | : メチオニン |
| 25 | Glu | : グルタミン酸 |
| | Asp | : アスパラギン酸 |
| | Lys | : リジン |
| | Arg | : アルギニン |
| | His | : ヒスチジン |

| | | |
|----|---------|---------------------------|
| | P h e | : フェニルアラニン |
| | T y r | : チロシン |
| | T r p | : トリプトファン |
| | P r o | : プロリン |
| 5 | A s n | : アスパラギン |
| | G l n | : グルタミン |
| | p G l u | : ピログルタミン酸 |
| | M e | : メチル基 |
| | E t | : エチル基 |
| 10 | B u | : ブチル基 |
| | P h | : フェニル基 |
| | T C | : チアゾリジノー 4 (R) -カルボキサミド基 |

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

| | | |
|----|----------------------|-----------------------|
| 15 | T o s | : p-トルエンスルフォニル |
| | C H O | : ホルミル |
| | B z l | : ベンジル |
| | C l ₂ Bzl | : 2, 6-ジクロロベンジル |
| 20 | B o m | : ベンジルオキシメチル |
| | Z | : ベンジルオキシカルボニル |
| | C l-Z | : 2-クロロベンジルオキシカルボニル |
| | B r-Z | : 2-ブロモベンジルオキシカルボニル |
| | B o c | : t-ブトキシカルボニル |
| 25 | D N P | : ジニトロフェノール |
| | T r t | : トリチル |
| | B u m | : t-ブトキシメチル |
| | F m o c | : N-9-フルオレニルメトキシカルボニル |
| | H O B t | : 1-ヒドロキシベンズトリアゾール |

- HOOB t : 3, 4-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-4-オキソ-
1, 2, 3-ベンゾトリアジン
- HONB : 1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3-ジカルボキシイミド
- DCC : N、N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド
- 5 BHA : ベンツヒドリルアミン
- MeBzl : 4-メチルベンジル
- OcHex : シクロヘキシルエステル
- NMP : N-メチルピロリドン
- TFA : トリフルオロ酢酸

10

本明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

[配列番号：1]

本発明のマウス由来新規リガンド蛋白質K i S S-1（マウス型1）のアミノ酸配列を示す。

15

[配列番号：2]

本発明のマウス由来新規リガンド蛋白質K i S S-1（マウス型2）のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：3]

本発明のラット由来新規リガンド蛋白質K i S S-1（ラット型）のアミノ酸配列を示す。

20

[配列番号：4]

本発明のマウス由来新規リガンド蛋白質K i S S-1（マウス型1）をコードするcDNAの塩基配列を示す。

[配列番号：5]

本発明のマウス由来新規リガンド蛋白質K i S S-1（マウス型2）をコードするcDNAの塩基配列を示す。

25

[配列番号：6]

本発明のラット由来新規リガンド蛋白質K i S S-1（ラット型）をコードするcDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号： 7〕

ヒト由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質hOT7T175のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号： 8〕

5 ラット由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質rOT7T175のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号： 9〕

本発明のマウス由来K i S S - 1をクローニングするために使用したプローブAの塩基配列を示す。

10 〔配列番号： 1 0〕

本発明のマウス由来K i S S - 1をクローニングするために使用したプライマーBの塩基配列を示す。

〔配列番号： 1 1〕

15 本発明のマウス由来K i S S - 1をクローニングするために使用したプライマーCの塩基配列を示す。

〔配列番号： 1 2〕

本発明のマウス由来K i S S - 1をクローニングするために使用したプライマーDの塩基配列を示す。

〔配列番号： 1 3〕

20 本発明のマウス由来K i S S - 1をクローニングするために使用したプライマーEの塩基配列を示す。

〔配列番号： 1 4〕

25 本発明のラット型リガンド（1-54）〔ラットK i S S - 1〕をコードするcDNAをクローニングするために使用したデジェネレートプライマー13-3F38の塩基配列を示す。

〔配列番号： 1 5〕

本発明のラット型リガンド（1-54）〔ラットK i S S - 1〕をコードするcDNAをクローニングするために使用したデジェネレートプライマーK i S S 357Rの塩基配列を示す。

[配列番号：16]

ラットKiSS-1の部分ペプチドをコードする配列を有するDNA断片の塩基配列を示す。

[配列番号：17]

- 5 ラットKiSS-1全長ペプチドをコードするDNA断片を得るためのプライマー288-41Fの塩基配列を示す。

[配列番号：18]

ラットKiSS-1全長ペプチドをコードするDNA断片を得るためのプライマー288-10Fの塩基配列を示す。

- 10 [配列番号：19]

ラットKiSS-1全長ペプチドをコードするDNA断片を得るためのプライマー288-254Rの塩基配列を示す。

[配列番号：20]

- 15 ラットKiSS-1全長ペプチドをコードするDNA断片を得るためのプライマー288-44Rの塩基配列を示す。

[配列番号：21]

ラットKiSS-1全長ペプチドをコードするDNA断片を得るためのプライマーrKiSS364Fの塩基配列を示す。

[配列番号：22]

- 20 ラットKiSS-1全長ペプチドをコードするDNA断片を得るためのプライマーrKiSS859Rの塩基配列を示す。

[配列番号：23]

ラットKiSS-1全長ペプチドをコードする393塩基対のDNA断片の塩基配列を示す。

- 25 [配列番号：24]

マウス由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質mOT7T175のアミノ酸配列を示す。

[配列番号：25]

マウス由来新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質mOT7T175をコードす

るDNAの塩基配列を示す。

〔配列番号：26〕

後述の実施例3で用いられたプライマー1の塩基配列を示す。

〔配列番号：27〕

5 後述の実施例3で用いられたプライマー2の塩基配列を示す。

後述の実施例1で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) DH10B/pCMV-mKISS-1は、平成12(2000)年1月24日から茨城県つくば市東1-1-3の経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託番号FERM BP-7003として、平成11(1999)年12月16日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85の財団法人・発酵研究所(IFO)に寄託番号IFO 16348として寄託されている。

15 後述の実施例1で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) DH5 α /pCR2.1-mKISS-1.4Aは、平成12年3月6日から茨城県つくば市東1-1-3の経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託番号FERM BP-7073として、平成12年2月16日から財団法人・発酵研究所(IFO)に寄託番号IFO 16360として寄託されている。

20 後述の実施例2で得られた形質転換体エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) TOP10/pRKISS4は、平成12年3月16日から茨城県つくば市東1-1-3の経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託番号FERM BP-7093として、平成12年2月2日から財団法人・発酵研究所(IFO)に寄託番号IFO 16362として寄託されている。

25 後述の実施例3で得られた大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5 α /pCR-B1untII-mOT7T175は、2001年1月11日から茨城県つくば市東1-1-3の経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所(NIBH)に寄託番号FERM BP-7428として、2000年12月22日から大阪府大阪市淀川区十三本町2-17-85の財団法人・発酵研究所(IFO)

に寄託番号 I F O 1 6 5 2 3 として寄託されている。

以下に実施例を示して、本発明をより詳細に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。なお、大腸菌を用いての遺伝子操作法は、モレキュラー・クローニング (Molecular cloning) に記載されている方法に従った。

5

実施例 1

マウス型 K i S S - 1 の取得

cDNAのクローニングは、GENE TRAPPER (Life Technologies社) の処方に従って行った。プローブA (配列番号: 9) をビオチン化したのち、一本鎖にしたマウス胚cDNAライブラリー (スーパースクリプトcDNAライブラリー、Life Technologies社) とハイブリダイゼーションさせ、得られた一本鎖遺伝子を、プライマーB (配列番号: 10) を用いて二本鎖とした。この遺伝子を大腸菌DH10Bにエレクトロポレーションし、アンピシリン耐性を指標として形質転換体を得た。エレクトロポレーションは、E coli Pulser (BIO RAD社) を用い、電圧1.8kVで行った。得られた形質転換体を、プライマーB (配列番号: 10) とプライマーC (配列番号: 11) を用いたコロニーPCRによって選択、形質転換体: 大腸菌 (Escherichia coli) DH10B / pCMV-mKiSS-1を得た。このcDNAクローンの塩基配列よりORF (open reading frame) を推定 (配列番号: 4)、導き出されるアミノ酸配列 (配列番号: 1) を有する新規分泌性蛋白をmKiSS-1 (マウス型1) と命名した。

20

コロニーPCRは、Advantage2 cDNA polymerase Mix (CLONTECH社) 1/50量、プライマーB (配列番号: 10) 及びプライマーC (配列番号: 11) を各0.2 μ M、dNTPs 200 μ M、DMSO 1/25量及び酵素に添付のバッファーを加え、10 μ lの液量とした。PCR反応は、①94 $^{\circ}$ C・10分の後、②94 $^{\circ}$ C・10秒、60 $^{\circ}$ C・10秒、68 $^{\circ}$ C・1分のサイクルを25回繰り返し行った。

25

さらに、上記の pCMV-mKiSS-1 にコードされた塩基配列より、ORFの外側にプライマーD (配列番号: 12) およびプライマーE (配列番号: 13) を作製、mouse embryo Marathon Ready cDNA (CLONTECH社) を鋳型にPCRを行った。PCRは、Advantage2 cDNA polymerase Mix (CLONTECH社) 1/50量、プライマーD (配

- 列番号：1 2）及びプライマーE（配列番号：1 3）を各0.2 μ M、dNTPs 200 μ M、DMSO 1/25量及び酵素に添付のバッファーを加え、25 μ lの液量で、①94°C・2分の後、②94°C・10秒、68°C・1分30秒のサイクルを3回、③94°C・10秒、64°C・10秒、68°C・1分のサイクルを3回、④94°C・10秒、60°C・10秒、68°C・1分のサイクルを30回繰り返し、⑤最後に68°C、8分の伸長反応を行った。該PCR反応後の反応産物を、TOPO-TA cloning Kit（Invitrogen社）の処方に従いプラスミドベクターpCR2.1-TOPO（Invitrogen社）へサブクローニングした。これを大腸菌DH5 α に導入し、cDNAを持つクローンを、アンピシリンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析したところ、①上記mKiSS-1の塩基配列（配列番号：4）と完全一致するものの他に、②上記mKiSS-1の塩基配列（配列番号：4）の途中に12塩基の挿入、および、ORFから402番目に一塩基変異（アミノ酸不変）があるもの（配列番号：5）、の2種類が得られた。②についても、12塩基の挿入は4アミノ酸に翻訳でき、また、ヒト、ラット型KiSS-1ではともにこの4アミノ酸に相当するアミノ酸配列が存在することから、マウスには2種のmKiSS-1が存在するとみなし、新たに得られた塩基配列（核酸配列番号：5より推定されるアミノ酸配列（配列番号：2）を有する新規分泌性蛋白をmKiSS-1・4A（マウス型2）とした。この塩基配列を有するクローンを大腸菌に導入して形質転換体：大腸菌（*Escherichia coli*）DH5 α /pCR2.1-mKiSS-1.4Aを得た。
- 得られた核酸配列から推定されたマウス型1およびマウス型2のKiSS-1蛋白質のアミノ酸配列（それぞれ配列番号：4および5）は既知のヒトホモログに対して高い相同性を有していた（図1参照）。

プローブA

5' -tat ggg gag ccg ctg gca aaa gtg-3'

25 プライマーB

5' -tag acc tgc ccc ttc ctc cca ga-3'

プライマーC

5' -ctg ctg gcc tgt gga tcc agg ctt-3'

プライマーD

5' - tgc agg aga gtg aag att aaa tcc cca - 3'

プライマーE

5' - gag gac ctg tcc cat ctc gca gga gtc a - 3'

5 実施例 2

ラット型リガンド (1-54) [ラットKiSS-1] をコードする cDNA のクローニング

ラット胎盤からTRIZOL reagent (Gibco BRL社) を用い、添付されたマニュアルに記載された方法に従ってtotal RNAを抽出した。次いでオリゴdTセルロース
10 カラム (MessageMaker reagent assembly, Gibco BRL社) を用い、添付されたマニュアルに記載された方法に従って該total RNAからpoly(A)⁺ RNAを調製した。
さらに、SuperScript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Gibco BRL社) を用い、添付されたマニュアルに記載された方法に従って、該Poly (A)⁺ RNAから first strand cDNA を合成した。また、マウスKiSS-1
15 配列を基にデザインした次のデジェネレートプライマー (degenerate primer) を合成した。

13-3F38: 5' - TTCTTGGCAGCTRCTGCTTYTCCTCTGTG - 3' (配列番号: 14)

KiSS357R: 5' - GAAGCGCAGGCCGAAGGAGTTCCA - 3' (配列番号: 15)

20 前述の first strand cDNA を鋳型として用い、13-3F38およびKiSS357Rをプライマーとして用いてデジェネレートPCR (Degenerative PCR) 反応を実施した。
該PCR反応における反応液は、Taq polymerase (宝酒造社) を1 μ l、それぞれ添付の10x PCR buffer (500 mM KCl-100 mM Tris \cdot HCl, pH 8.3) を10 μ l、25 mM MgCl₂ を6 μ l、2.5 mM dNTP mixtureを8 μ l、25 % DMSO溶液を4 μ l、プライマ
25 ー13-3F38およびプライマーKiSS357R (ともに20 μ M) を各2 μ l、および該鋳型cDNA (前述の first strand cDNA) を2 μ l、蒸留水を65 μ lを混合して作製した。該PCRとして、1) 初期変性 (94 $^{\circ}$ C \cdot 5分間)、2) サイクル反応 (94 $^{\circ}$ C \cdot 20秒間-72 $^{\circ}$ C \cdot 50秒間) 3) サイクル反応 (94 $^{\circ}$ C \cdot 20秒間-71.5 $^{\circ}$ C \cdot 20秒間-72 $^{\circ}$ C \cdot 30秒間) 4) サイクル反応 (94 $^{\circ}$ C \cdot 20秒間-71 $^{\circ}$ C \cdot 20秒間-72 $^{\circ}$ C \cdot 30秒間)、5) サイク

ル反応 (94°C・20秒間-70.5°C・20秒間-72°C・30秒間)、6) サイクル反応 (94°C・20秒間-70°C・20秒間-72°C・30秒間)、7) サイクル反応 (94°C・20秒間-69.5°C・20秒間-72°C・30秒間)、8) サイクル反応 (94°C・20秒間-69°C・20秒間-72°C・30秒間)、9) サイクル反応 (94°C・20秒間-68.5°C・20秒間-72°C・30秒間)、10) サイクル反応 (94°C・20秒間-68°C・20秒間-72°C・30秒間)、11) 30回のサイクル反応 (94°C・20秒間-61.8°C・20秒間-72°C・30秒間) の後 12) 最終伸長反応 (72°C・7分間) を行いPCR産物を得た。

さらにPCR 産物を1.5 %アガロースゲル電気泳動を行い、サイバーグリーン染色される約300 bpのバンドを含むゲル片を剃刀で切り出した。該ゲル片より Gene Clean DNA 抽出キット (BIO 101社) を用いてPCR 産物であるDNA断片を回収した。該DNA断片の塩基配列決定のための反応は、Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems、パーキンエルマー社) を用いて行い、蛍光式自動シーケンサー (DNA sequencer Prism 377 : Applied Biosystems、パーキンエルマー社) を用いてPCR 産物の塩基配列を解読した。その結果、ラット KiSS-1の部分ペプチドをコードする配列を有するDNA断片を得ることができた。以下にデジェネレートプライマー部分を含まない288 bpの塩基配列 (配列番号 : 16) pCR288bpを示す。

pCR288bp :

TGGCCTCTTT TGGGGAGCCA CTGGCAAAAA TGGCACCTGT GGTGAACCCT GAACCCACAG 60
GCCAACAGTC CGGACCCCAG GAACTCGTTA ATGCCTGGCA AAAGGGCCCG CGGTATGCAG 120
AGAGCAAGCC TGGGGCTGCA GGA CTGCGCG CTCGCCGAAC ATCGCCATGC CCGCCGGTGG 180
AGAACCCAC GGGGCACCAG CGGCCCCCGT GTGCCACCG CAGTCGCCTG ATCCCTGCGC 240
CCCGCGGATC GGTGCTGGTG CAGCGCGAGA AGGACATGTC AGCCTACA 288
(配列番号 : 16)

得られた配列よりプライマー 288-41F (配列番号 : 17)、288-10F (配列番号 : 18)、288-254R (配列番号 : 19)、288-44R (配列番号 : 20) を作成し、以下に記した5'-RACE及び3'-RACE実験に用いた。

288-41F: 5'-GGTGAACCCTGAACCCACAGGCCAACAG-3' (配列番号 : 17)

288-10F: 5'-TTGGGGAGCCACTGGCAAAAATGGCACC-3' (配列番号: 18)

288-254R: 5'-TGACATGTCCTTCTCGCGTGCACCAGC-3' (配列番号: 19)

288-44R: 5'-GGACTGTTGGCCTGTGGGTTCAGGGTTC-3' (配列番号: 20)

5 ラット肝臓cDNAを鋳型として5'-RACE及び3'-RACE反応を実施した。5'-RACE及
び3'-RACEのPCR反応液はTaq polymerase(宝酒造社)を0.5 μ l、添付の10x PCR
buffer(500 mM KCl-25 mM MgCl₂-100 mM Tris · HCl, pH 8.3)を5 μ l、2.5 mM
dNTP mixtureを4 μ l、25 mM MgCl₂を3 μ l、25 % DMSO溶液を2 μ l (3'-RACEの
場合)、10 μ Mプライマー288-10F(3'-RACEの場合)あるいは10 μ Mプライマー
10 288-254R(5'-RACEの場合)を1 μ l、10 μ MプライマーAP1 (プライマーAP1は
CLONTECH社のMarathon-Ready cDNA Kitに添付のもの)を1 μ l、鋳型ラット肝臓
cDNA (CLONTECH社、Marathon-Ready cDNA Kit、rat liver)を5 μ l、及び蒸留
水を28.5 μ l (3'-RACEの場合)あるいは30.5 μ l (5'-RACEの場合)を混合して作製
した。反応条件は94°C・60秒の初期変性後、94°C・30秒-72°C・120秒のサイクル反
15 応を5回、94°C・30秒-70°C・120秒のサイクル反応を5回、94°C・20秒-68°C・120秒の
サイクル反応を25回、および68°C・10分の最終伸長反応とした。

続いて、該PCR反応の反応液を鋳型としてnested PCRを実施した。反応液はTaq
polymerase(宝酒造社)を0.5 μ l、添付の10x PCR buffer(500 mM KCl-25 mM
MgCl₂-100 mM Tris · HCl, pH 8.3)を5 μ l、2.5 mM dNTP mixtureを4 μ l、25
20 mM MgCl₂を3 μ l、25 % DMSO溶液を2 μ l (3'-RACEの場合)、10 μ Mプライマー
288-41F(3'-RACEの場合)あるいは10 μ Mプライマー288-44R(5'-RACEの場合)を1
 μ l、10 μ MプライマーAP2 (プライマーAP2はCLONTECH社のMarathon-Ready
cDNA Kitに添付のもの)を1 μ l、鋳型DNA (該PCR反応液50倍希釈液)を5 μ l、
及び蒸留水を28.5 μ l (3'-RACEの場合)あるいは30.5 μ l (5'-RACEの場合)を混合
25 して作製した。反応条件は94°C・60秒の初期変性後、94°C・30秒-72°C・120秒のサ
イクル反応を5回、94°C・30秒-70°C・120秒のサイクル反応を5回、94°C・20秒-
68°C・120秒のサイクル反応を25回、および68°C・10分の最終伸長反応とした。

さらにnested PCR 産物から前述の方法によりDNA断片を回収した。該DNA断片
をTOPO-TA Cloning Kit (Invitrogen社)を用いて、添付のマニュアルに記載さ

れた方法に従ってプラスミドベクターpCR2.1に連結し、大腸菌TOP10をトランス
フォームさせた。単一コロニーより大腸菌をピックアップし、LB培地中にて液体
培養終了後、集菌してプラスミド精製キット (QIAGEN社、QIAwell 8 Ultra
plasmid purification kit) を用いてプラスミドを精製した。該プラスミド中の
5 PCR 産物の塩基配列を前述の方法により解読し、5' 端、3' 端の配列情報を得た。
この配列情報よりプライマーrKiSS364F、rKiSS859Rを作成した。

rKiSS364F: 5'-CGTCTCAGCCTCTGGACACCCTGTGGATCTGCC-3' (配列番号: 2 1)

rKiSS859R: 5'-TGGCGACAGCATTTGCTTTTATTGCACAAGTCTA-3' (配列番号: 2 2)

10 ラット肝臓cDNAを鋳型としてプライマーrKiSS364FとrKiSS859Rを用いてPCRを
実施した。PCR反応液はPfu DNA polymerase(Stratagene社)を1 μ l、添付の10x
PCR buffer(500 mM KCl-25 mM MgCl₂-100 mM Tris·HCl, pH 8.3)を5 μ l、2.5
mM dNTP mixtureを4 μ l、25 % DMSO溶液を2 μ l、10 μ MプライマーrKiSS364F
及びrKiSS859Rを各1 μ l、鋳型ラット肝臓cDNA (CLONTECH社、Marathon-Ready
15 cDNA Kit、rat liver) を5 μ l、及び蒸留水を31 μ lを混合して作製した。反応
条件は94 $^{\circ}$ C・60秒の初期変性後、94 $^{\circ}$ C・20秒-72 $^{\circ}$ C・120秒のサイクル反応を3回、
94 $^{\circ}$ C・20秒-70 $^{\circ}$ C・120秒のサイクル反応を3回、94 $^{\circ}$ C・20秒-68 $^{\circ}$ C・120秒のサイクル
反応を3回、94 $^{\circ}$ C・20秒-63 $^{\circ}$ C・30秒-68 $^{\circ}$ C・120秒のサイクル反応を30回、および
68 $^{\circ}$ C・10分の最終伸長反応とした。得られたDNA断片をpPCR-BluntII-TOPO vector
20 (Stratagene社)を用いて添付のマニュアルに記載された方法に従ってクローニン
グした。クローニングされたDNA配列を前述の方法により解読し、ラットKiSS-1
全長ペプチドをコードする393 bpのDNA断片(配列番号2 5)を有するpRKISS4を得
ることができた。該プラスミドによりトランスフォームさせた大腸菌TOP10を、
TOP10/pRKISS4と命名した。

25 得られた核酸配列から推定されたラット型KiSS-1蛋白質のアミノ酸配列
(配列番号: 6) は既知のヒトホモログに対して高い相同性を有していた (図1
参照)。

pRKISS4(393bp):

ATGACCTCGC TGGCTTCTTG GCAGCTGCTG CTTCTCCTCT GTGTGGCCTC TTTTGGGGAG 60
CCACTGGCAA AAATGGCACC TGTGGTGAAC CCTGAACCCA CAGGCCAACA GTCCGGACCC 120
CAGGAACTCG TTAATGCCTG GCAAAAGGGC CCGCGGTATG CAGAGAGCAA GCCTGGGGCT 180
GCAGGACTGC GCGCTCGCCG AACATCGCCA TCCCCGCCGG TGGAGAACCC CACGGGGCAC 240
5 CAGCGGCCCC CGTGTGCCAC CCGCAGTCGC CTGATCCCTG CGCCCCGCGG ATCGGTGCTG 300
GTGCAGCGCG AGAAGGACAT GTCAGCCTAC AACTGGAACCT CCTTTGGCCT GCGCTACGGC 360
AGGAGGCAGG TGGCGCGGGC GGCACGGGGC TGA 393

(配列番号：23)

10 実施例3

マウス全脳由来 新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNA
のクローニングと塩基配列の決定

マウス全脳cDNA (CLONTECH社) を鋳型とし、2個のプライマー、プライマー1
(配列番号：26) およびプライマー2 (配列番号：27) を用いてPCR反応を行
15 った。該反応における反応液の組成は、上記cDNAを10分の1量鋳型として使用し、
Pfu Turbo DNA Polymerase (STRATAGENE社) 1/50量、プライマー1およびプライ
マー2を各0.2 μ M、dNTPs 200 μ M、および酵素に添付のバッファーを加え、25 μ
lの液量とした。PCR反応は、①94°C・2分の後、②94°C・20秒、72°C・2分のサイ
クルを3回、③94°C・20秒、68°C・2分のサイクルを3回、④94°C・20秒、62°C・20秒、
20 68°C・1分30秒のサイクルを38回繰り返し、最後に68°C・7分の伸長反応を行った。
該PCR反応後の反応産物を、Zero-blunt TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen
社) の処方に従い、プラスミドベクターpCR-Blunt II-TOPO (Invitrogen社)
へサブクローニングした。これを大腸菌DH5 α に導入し、cDNAを持つクローンを、
カナマイシンを含むLB寒天培地中で選択した。個々のクローンの配列を解析した
25 結果、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAの塩基配列 (配列
番号：25) を得た。この塩基配列より導き出される396残基からなるアミノ酸
配列 (配列番号：24) は、既知G蛋白質共役型レセプターであるr0T7T175
(GPR54) との間に、94.4%ともしっかり高い相同性がみられた。また、そのヒト
型カウンターパートであるh0T7T175 (WO 00/24890) との間にも

82.4%の相同性が見られたことから、これらのマウス型カウンターパートであると考えられた。そこで、このアミノ酸配列を含有する新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をmOT7T175と命名した。またmOT7T175配列を有する上記の形質転換体を、大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5 α /pCR-Blunt II-mOT7T175と命名した。

5

産業上の利用可能性

本発明により、ラットおよびマウス由来の新規リガンド蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらの塩、およびそれらをコードするポリヌクレオチド（例えば、DNA、RNAおよびそれらの誘導体）が提供される。該ポリヌクレオチドを含むベクター、それを用いた該リガンド蛋白質の製造方法も提供される。該蛋白質等に対する抗体、アンタゴニスト、これらのスクリーニング方法およびキットも提供される。該蛋白質等、該ポリヌクレオチド、またはそれらに対する抗体、またはアンタゴニスト等を含有する医薬等も提供される。

10

請 求 の 範 囲

1. 配列番号：1または配列番号：3で表されるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とする蛋白質またはその塩。
- 5 2. 該実質的に同一のアミノ酸配列が配列番号：2で表されるアミノ酸配列である請求項1記載の蛋白質またはその塩。
3. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から132から141番目のアミノ酸配列を含有することを特徴とする請求項1記載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。
- 10 4. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から127から141番目のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩。
5. 配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN末端から90から141番目のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有する請求項3記載の部分ペプチドまたはその塩。
- 15 6. 配列番号：2で表されるアミノ酸配列のN末端から94から145番目のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有する請求項1記載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。
7. 配列番号：3で表されるアミノ酸配列のN末端から110から119番目のアミノ酸配列を含有することを特徴とする請求項1記載の蛋白質の部分ペプチドまたはその塩。
- 20 8. 配列番号：3で表されるアミノ酸配列のN末端から105から119番目のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有する請求項7記載の部分ペプチドまたはその塩。
- 25 9. 配列番号：3で表されるアミノ酸配列のN末端から68から119番目のアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有する請求項7記載の部分ペプチドまたはその塩。
10. 請求項1記載の蛋白質をコードするポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチド。

- 1 1. 請求項 3、6 または 7 記載の部分ペプチドをコードするポリヌクレオチド
を含有するポリヌクレオチド。
- 1 2. DNA である請求項 10 または 11 記載のポリヌクレオチド。
- 1 3. 配列番号：4、配列番号：5 または配列番号：6 で表される塩基配列を有
5 する請求項 10 記載のポリヌクレオチド。
- 1 4. 請求項 10 または 11 記載のポリヌクレオチドを含有する組換えベクター。
- 1 5. 請求項 14 記載の組換えベクターで形質転換された形質転換体。
- 1 6. 請求項 15 記載の形質転換体を培養し、請求項 1 記載の蛋白質または請求
項 3、6 もしくは 7 記載の部分ペプチドを生成・蓄積せしめることを特徴とする
10 請求項 1 記載の蛋白質もしくはその塩または請求項 3、6 もしくは 7 記載の部分
ペプチドまたはその塩の製造方法。
- 1 7. 請求項 1 記載の蛋白質もしくはその塩または請求項 3、6 もしくは 7 記載
の部分ペプチドまたはその塩に対する抗体。
- 1 8. 請求項 1 記載の蛋白質または請求項 3、6 もしくは 7 記載の部分ペプチド
15 のシグナル伝達を不活性化する中和抗体である請求項 17 記載の抗体。
- 1 9. 請求項 1 記載の蛋白質もしくはその塩または請求項 3、6 もしくは 7 記載
の部分ペプチドまたはその塩を用いることを特徴とする、レセプターと請求項 1
記載の蛋白質もしくはその塩または請求項 3、6 もしくは 7 記載の部分ペプチド
またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法。
20 20. 請求項 1 記載の蛋白質もしくはその塩または請求項 3、6 もしくは 7 記載
の部分ペプチドまたはその塩を含有することを特徴とする、レセプターと請求項
1 記載の蛋白質もしくはその塩または請求項 3、6 もしくは 7 記載の部分ペプチ
ドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング用
キット。
- 25 21. レセプターが配列番号：7、配列番号：8 または配列番号：24 で表され
るアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を有することを特徴と
する蛋白質またはその塩である請求項 19 記載のスクリーニング方法または請求
項 20 記載のスクリーニング用キット。
22. 請求項 19 記載のスクリーニング方法または請求項 20 記載のスクリーニ

ング用キットを用いて得ることのできる、レセプターと請求項 1 または請求項 3 ないし 5 のいずれか 1 項記載の蛋白質またはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩。

23. アゴニストである請求項 22 記載の化合物またはその塩。

- 5 24. 請求項 19 記載のスクリーニング方法または請求項 20 記載のスクリーニング用キットを用いて得ることのできる、レセプターと請求項 1 記載の蛋白質もしくはその塩または請求項 3、6 もしくは 7 記載の部分ペプチドまたはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩を含有してなる医薬組成物。

25. 癌転移抑制剤である請求項 24 記載の医薬組成物。

- 10 26. 請求項 17 記載の抗体を用いることを特徴とする、請求項 1 記載の蛋白質または請求項 3、6 もしくは 7 記載の部分ペプチドの定量方法。

27. 請求項 1 記載の蛋白質もしくはその塩または請求項 3、6 もしくは 7 記載の部分ペプチドまたはその塩を含有してなる医薬組成物。

28. 癌転移抑制剤である請求項 27 記載の医薬組成物。

図 1

KISS-1 配列比較

| | | |
|--------|--|-----------|
| ヒト型 | 1:-----MNSLVSQQLLFLCATHFGEPLKVASVGNRPT | 34 |
| マウス型 1 | 1:MYLRFQVDCSLSPWKETVDLPLPRMI SMASWQLLLLLLCVATYGEPLAK---- | VKPGST 56 |
| マウス型 2 | 1:MYLRFQVDCSLSPWKETVDLPLPRMI SMASWQLLLLLLCVATYGEPLAKVAPLVKPGST | 60 |
| ラット型 | 1:-----MISLASWQLLLLLLCVASFGEPLAKMAPVVNPEPT | 34 |
| | * * * * * | * |

| | | |
|--------|--|-----|
| ヒト型 | 35:GQQLESGLLAPGEQSLPCTERKPAATARLSRRGTSLSPPPESSGSRQQGLSAPHSRQI | 94 |
| マウス型 1 | 57:GQQSGPQELVNAWEKESRYAESKPGSAGLRARRSSP-CPPVEGPAGRQRP-LCASRSRLI | 114 |
| マウス型 2 | 61:GQQSGPQELVNAWEKESRYAESKPGSAGLRARRSSP-CPPVEGPAGRQRP-LCASRSRLI | 118 |
| ラット型 | 35:GQQSGPQELVNAWQKGPARYAESKPGAAGLRARRTSP-CPPVENPTGHQRP-PCATRSRLI | 92 |
| | *** * * * * | *** |

| | | |
|--------|---|-----|
| ヒト型 | 95:PAPQGAVLVQREKDLPNYNWNSFGLRFGKREAAPGNHGRSAGRWGAGAGQ | 145 |
| マウス型 1 | 115:PAPRGAVLVQREKDLSTYNWNSFGLRYGRRQAARAARG----- | 152 |
| マウス型 2 | 119:PAPRGAVLVQREKDLSTYNWNSFGLRYGRRQAARAARG----- | 156 |
| ラット型 | 93:PAPRGSVLVQREKDM SAYNWNWNSFGLRYGRRQVARAARG----- | 130 |
| | *** * * * * | * |

SEQUENCE LISTING

<110> Takeda Chemical Industries, Ltd.

<120> Novel protein, DNA encoding the same, and process for preparation
5 thereof

<130> 662503

<150> JP 2000-093575

<151> 2000-03-30

<160> 27

10 <210> 1

<211> 152

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 1

15 Met Tyr Leu Arg Phe Gly Val Asp Val Cys Ser Leu Ser Pro Trp Lys

5

10

15

Glu Thr Val Asp Leu Pro Leu Pro Pro Arg Met Ile Ser Met Ala Ser

20

25

30

Trp Gln Leu Leu Leu Leu Leu Cys Val Ala Thr Tyr Gly Glu Pro Leu

20

35

40

45

Ala Lys Val Ala Pro Gly Ser Thr Gly Gln Gln Ser Gly Pro Gln Glu

50

55

60

Leu Val Asn Ala Trp Glu Lys Glu Ser Arg Tyr Ala Glu Ser Lys Pro

65

70

75

80

25 Gly Ser Ala Gly Leu Arg Ala Arg Arg Ser Ser Pro Cys Pro Pro Val

85

90

95

Glu Gly Pro Ala Gly Arg Gln Arg Pro Leu Cys Ala Ser Arg Ser Arg

100

105

110

Leu Ile Pro Ala Pro Arg Gly Ala Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp

2/16

115 120 125
Leu Ser Thr Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg Tyr Gly Arg Arg
130 135 140
Gln Ala Ala Arg Ala Ala Arg Gly
5 145 150
<210> 2
<211> 156
<212> PRT
<213> Mouse
10 <400> 2
Met Tyr Leu Arg Phe Gly Val Asp Val Cys Ser Leu Ser Pro Trp Lys
5 10 15
Glu Thr Val Asp Leu Pro Leu Pro Pro Arg Met Ile Ser Met Ala Ser
20 25 30
15 Trp Gln Leu Leu Leu Leu Cys Val Ala Thr Tyr Gly Glu Pro Leu
35 40 45
Ala Lys Val Ala Pro Leu Val Lys Pro Gly Ser Thr Gly Gln Gln Ser
50 55 60
Gly Pro Gln Glu Leu Val Asn Ala Trp Glu Lys Glu Ser Arg Tyr Ala
20 65 70 75 80
Glu Ser Lys Pro Gly Ser Ala Gly Leu Arg Ala Arg Arg Ser Ser Pro
85 90 95
Cys Pro Pro Val Glu Gly Pro Ala Gly Arg Gln Arg Pro Leu Cys Ala
100 105 110
25 Ser Arg Ser Arg Leu Ile Pro Ala Pro Arg Gly Ala Val Leu Val Gln
115 120 125
Arg Glu Lys Asp Leu Ser Thr Tyr Asn Trp Asn Ser Phe Gly Leu Arg
130 135 140
Tyr Gly Arg Arg Gln Ala Ala Arg Ala Ala Arg Gly

3/16

145 150 155

<210> 3

<211> 130

<212> PRT

5 <213> Rat

<400> 3

Met Thr Ser Leu Ala Ser Trp Gln Leu Leu Leu Leu Leu Cys Val Ala

 5 10 15

Ser Phe Gly Glu Pro Leu Ala Lys Met Ala Pro Val Val Asn Pro Glu

10 20 25 30

Pro Thr Gly Gln Gln Ser Gly Pro Gln Glu Leu Val Asn Ala Trp Gln

 35 40 45

Lys Gly Pro Arg Tyr Ala Glu Ser Lys Pro Gly Ala Ala Gly Leu Arg

 50 55 60

15 Ala Arg Arg Thr Ser Pro Cys Pro Pro Val Glu Asn Pro Thr Gly His

 65 70 75 80

Gln Arg Pro Pro Cys Ala Thr Arg Ser Arg Leu Ile Pro Ala Pro Arg

 85 90 95

Gly Ser Val Leu Val Gln Arg Glu Lys Asp Met Ser Ala Tyr Asn Trp

20 100 105 110

Asn Ser Phe Gly Leu Arg Tyr Gly Arg Arg Gln Val Ala Arg Ala Ala

 115 120 125

Arg Gly

 130

25 <210> 4

<211> 449

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 4

4/16

atgtatctga gatttggcgt tgatgtctgc agcctgagtc cctggaagga gactgtagac 60
ctgccccttc ctcccagaat tctcaatggc ttcttggcag ctgctgcttc tcctctgtgt 120
cgccacctat ggggagccgc tggcaaaagt gaagcctgga cacaggccag cagtccggac 180
cccaggaact cgttaatgcc tgggaaaagg aatcgcggtg tgcaagagagc aagcctgggt 240
5 gcagggctgc gcgctcgtag gtcgtcgcca tgcccgcggg ttgagggccc cgcggggcgc 300
cagcgggccc tgtgtgcctc gcagtcgcct gatccctgag ccccgcggag cgggtgctgt 360
gcagcgggag aaggacctgt ccacctacaa ctggaactcc cggcctgcgc tacggcagga 420
ggcaggcggc gcgggcagca cggggctga 449

<210> 5

10 <211> 458

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 5

atgtatctga gatttggcgt tgatgtctgc agcctgagtc cctggaagga gactgtagac 60
15 ctgccccttc ctcccagaat tctcaatggc ttcttggcag ctgctgcttc tcctctgtgt 120
cgccacctat ggggagccgc tggcaaaagt ggcacctttg gaagcctgga tccacaggcc 180
agcagtcagg accccaggaa ctcgttaatg cctgggaaaa ggaatcgagg tatgcagaga 240
aagcctgggt ctgcagggct gcgcgctcgt aggtcgtcgc catgcccgcc ggttgagggc 300
cccgcggggc gccagcggcc tgtgtgcctc ccgcagtcgc ctgatccctg cgcggcgagg 360
20 agcgggtgtg gtgcagcggg agaaggacct gtcgacctac ctggaactcc ttgggcctgc 420
gtacggcag gaggcaggcg gcgcgggcag cacggggc 458

<210> 6

<211> 390

<212> DNA

25 <213> Rat

<400> 6

atgacctgc tggtttcttg gcagctgtg cttctcctct gtgtggcctc ttttggggag 60
ccactggcaa aaatggcacc tgttgtgaac cctgaacca caggccaaca gtccggaccc 120
caggaactcg ttaatgcctg gcaaaagggc ccgcggtatg cagagagcaa gcctggggct 180

5/16

gcaggactgc gcgctcgccg aacatcgcca tgcccgccgg tggagaaccc cacggggcac 240
cagcgggccc cgtgtgccac ccgcagtcgc ctgatccctg cgccccgagg atcggtgctg 300
gtgcagcgcg agaaggacat gtcagcctac aactggaact cctttggcct gcgctacggc 360
aggaggcagg tggcgcgggc ggcacggggc 390

5 <210> 7

<211> 398

<212> PRT

<213> Human

<400> 7

10 Met His Thr Val Ala Thr Ser Gly Pro Asn Ala Ser Trp Gly Ala Pro

5

10

15

Ala Asn Ala Ser Gly Cys Pro Gly Cys Gly Ala Asn Ala Ser Asp Gly

20

25

30

Pro Val Pro Ser Pro Arg Ala Val Asp Ala Trp Leu Val Pro Leu Phe

15

35

40

45

Phe Ala Ala Leu Met Leu Leu Gly Leu Val Gly Asn Ser Leu Val Ile

50

55

60

Tyr Val Ile Cys Arg His Lys Pro Met Arg Thr Val Thr Asn Phe Tyr

65

70

75

80

20 Ile Ala Asn Leu Ala Ala Thr Asp Val Thr Phe Leu Leu Cys Cys Val

85

90

95

Pro Phe Thr Ala Leu Leu Tyr Pro Leu Pro Gly Trp Val Leu Gly Asp

100

105

110

Phe Met Cys Lys Phe Val Asn Tyr Ile Gln Gln Val Ser Val Gln Ala

25

115

120

125

Thr Cys Ala Thr Leu Thr Ala Met Ser Val Asp Arg Trp Tyr Val Thr

130

135

140

Val Phe Pro Leu Arg Ala Leu His Arg Arg Thr Pro Arg Leu Ala Leu

145

150

155

160

6/16

Ala Val Ser Leu Ser Ile Trp Val Gly Ser Ala Ala Val Ser Ala Pro
165 170 175
Val Leu Ala Leu His Arg Leu Ser Pro Gly Pro Arg Ala Tyr Cys Ser
180 185 190
5 Glu Ala Phe Pro Ser Arg Ala Leu Glu Arg Ala Phe Ala Leu Tyr Asn
195 200 205
Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Ala Thr Cys Ala Cys Tyr
210 215 220
Ala Ala Met Leu Arg His Leu Gly Arg Val Ala Val Arg Pro Ala Pro
10 225 230 235 240
Ala Asp Ser Ala Leu Gln Gly Gln Val Leu Ala Glu Arg Ala Gly Ala
245 250 255
Val Arg Ala Lys Val Ser Arg Leu Val Ala Ala Val Val Leu Leu Phe
260 265 270
15 Ala Ala Cys Trp Gly Pro Ile Gln Leu Phe Leu Val Leu Gln Ala Leu
275 280 285
Gly Pro Ala Gly Ser Trp His Pro Arg Ser Tyr Ala Ala Tyr Ala Leu
290 295 300
Lys Thr Trp Ala His Cys Met Ser Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Asn Pro
20 305 310 315 320
Leu Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ser His Phe Arg Gln Ala Phe Arg Arg
325 330 335
Val Cys Pro Cys Ala Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Arg Arg Pro Gly
340 345 350
25 Pro Ser Asp Pro Ala Ala Pro His Ala Glu Leu His Arg Leu Gly Ser
355 360 365
His Pro Ala Pro Ala Arg Ala Gln Lys Pro Gly Ser Ser Gly Leu Ala
370 375 380
Ala Arg Gly Leu Cys Val Leu Gly Glu Asp Asn Ala Pro Leu

7/16

385 390 395
<210> 8
<211> 396
<212> PRT
5 <213> Rat
<400> 8
Met Ala Ala Glu Ala Thr Leu Gly Pro Asn Val Ser Trp Trp Ala Pro
 5 10 15
Ser Asn Ala Ser Gly Cys Pro Gly Cys Gly Val Asn Ala Ser Asp Gly
10 20 25 30
Pro Gly Ser Ala Pro Arg Pro Leu Asp Ala Trp Leu Val Pro Leu Phe
 35 40 45
Phe Ala Ala Leu Met Leu Leu Gly Leu Val Gly Asn Ser Leu Val Ile
 50 55 60
15 Phe Val Ile Cys Arg His Lys His Met Gln Thr Val Thr Asn Phe Tyr
65 70 75 80
Ile Ala Asn Leu Ala Ala Thr Asp Val Thr Phe Leu Leu Cys Cys Val
 85 90 95
Pro Phe Thr Ala Leu Leu Tyr Pro Leu Pro Thr Trp Val Leu Gly Asp
20 100 105 110
Phe Met Cys Lys Phe Val Asn Tyr Ile Gln Gln Val Ser Val Gln Ala
 115 120 125
Thr Cys Ala Thr Leu Thr Ala Met Ser Val Asp Arg Trp Tyr Val Thr
 130 135 140
25 Val Phe Pro Leu Arg Ala Leu His Arg Arg Thr Pro Arg Leu Ala Leu
145 150 155 160
Thr Val Ser Leu Ser Ile Trp Val Gly Ser Ala Ala Val Ser Ala Pro
 165 170 175
Val Leu Ala Leu His Arg Leu Ser Pro Gly Pro His Thr Tyr Cys Ser

8/16

| | | | | |
|----|---|-----|-----|-----|
| | 180 | 185 | 190 | |
| | Glu Ala Phe Pro Ser Arg Ala Leu Glu Arg Ala Phe Ala Leu Tyr Asn | | | |
| | 195 | 200 | 205 | |
| | Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Ala Thr Cys Ala Cys Tyr | | | |
| 5 | 210 | 215 | 220 | |
| | Gly Ala Met Leu Arg His Leu Gly Arg Ala Ala Val Arg Pro Ala Pro | | | |
| | 225 | 230 | 235 | 240 |
| | Thr Asp Gly Ala Leu Gln Gly Gln Leu Leu Ala Gln Arg Ala Gly Ala | | | |
| | 245 | 250 | 255 | |
| 10 | Val Arg Thr Lys Val Ser Arg Leu Val Ala Ala Val Val Leu Leu Phe | | | |
| | 260 | 265 | 270 | |
| | Ala Ala Cys Trp Gly Pro Ile Gln Leu Phe Leu Val Leu Gln Ala Leu | | | |
| | 275 | 280 | 285 | |
| | Gly Pro Ser Gly Ala Trp His Pro Arg Ser Tyr Ala Ala Tyr Ala Leu | | | |
| 15 | 290 | 295 | 300 | |
| | Lys Ile Trp Ala His Cys Met Ser Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Asn Pro | | | |
| | 305 | 310 | 315 | 320 |
| | Leu Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ser His Phe Arg Gln Ala Phe Cys Arg | | | |
| | 325 | 330 | 335 | |
| 20 | Val Cys Pro Cys Gly Pro Gln Arg Gln Arg Arg Pro His Ala Ser Ala | | | |
| | 340 | 345 | 350 | |
| | His Ser Asp Arg Ala Ala Pro His Ser Val Pro His Ser Arg Ala Ala | | | |
| | 355 | 360 | 365 | |
| | His Pro Val Arg Val Arg Thr Pro Glu Pro Gly Asn Pro Val Val Arg | | | |
| 25 | 370 | 375 | 380 | |
| | Ser Pro Ser Val Gln Asp Glu His Thr Ala Pro Leu | | | |
| | 385 | 390 | 395 | |

<210> 9

<211> 24

9/16

- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Designed oligonucleotide probe to amplify mouse KiSS-1 cDNA.
- 5 <400> 9
- tatggggagc cgctggcaaa agtg 24
- <210> 10
- <211> 23
- <212> DNA
- 10 <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Designed oligonucleotide primer to amplify mouse KiSS-1 cDNA.
- <400> 10
- tagacctgcc ccttcctccc aga 23
- 15 <210> 11
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- 20 <223> Designed oligonucleotide primer to amplify mouse KiSS-1 cDNA.
- <400> 11
- ctgctggcct gtggatccag gctt 24
- <210> 12
- <211> 27
- 25 <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Designed oligonucleotide primer to amplify mouse KiSS-1 cDNA.
- <400> 12

10/16

tgcaggagag tgaagattaa atcccca 27

<210> 13

<211> 28

<212> DNA

5 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify mouse KiSS-1 cDNA.

<400> 13

gaggacctgt cccatctcgc aggagtca 28

10 <210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

15 <223> Designed oligonucleotide primer to amplify rat KiSS-1 cDNA.

<400> 14

ttcttggcag ctctgctty tcctctgtg 29

<210> 15

<211> 24

20 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify rat KiSS-1 cDNA.

<400> 15

25 gaagcgcagg ccgaaggagt tcca 24

<210> 16

<211> 288

<212> DNA

<213> Rat

11/16

<400> 16
tggcctcttt tggggagcca ctggcaaaaa tggcacctgt ggtgaaccct gaaccacag 60
gccaacagtc cggaccccag gaactcgta atgcctggca aaagggccg cggtatgcag 120
agagcaagcc tggggctgca ggactgcgcg ctgccgaac atgccatgc ccgccgttg 180
5 agaaccacac ggggcaccag cggccccgt gtgccaccg cagtcgctg atccctgcg 240
cccgcgatc ggtgctggtg cagcgcgaga aggacatgtc agcctaca 288
<210> 17
<211> 28
<212> DNA
10 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Designed oligonucleotide primer for 3'-RACE to amplify rat KiSS-1
cDNA.
<400> 17
15 ggtgaaccct gaaccacag gccaacag 28
<210> 18
<211>
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
20 <220>
<223> Designed oligonucleotide primer to amplify rat KiSS-1 cDNA.
<400> 18
ttggggagcc actggcaaaa atggcacc 28
<210> 19
25 <211>
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Designed oligonucleotide primer to amplify rat KiSS-1 cDNA.

12/16

- <400> 19
tgacatgtcc ttctcgcgct gcaccagc 28
- <210> 20
<211> 28
- 5 <212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Designed oligonucleotide primer for 5'-RACE to amplify rat KiSS-1 cDNA.
- 10 <400> 20
ggactgttgg cctgtggggt cagggttc 28
<210> 21
<211> 33
<212> DNA
- 15 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> Designed oligonucleotide primer to amplify rat KiSS-1 cDNA.
<400> 21
cgtctcagcc tctggacacc ctgtggatct gcc 33
- 20 <210> 22
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
- 25 <223> Designed oligonucleotide primer to amplify rat KiSS-1 cDNA.
<400> 22
tggcgacagc attgctttta ttgcacaagt cta 33
<210> 23
<211> 393

13/16

<212> DNA

<213> Rat

<400> 23

atgacctcgc tggcttcttg gcagctgctg cttctcctct gtgtggcctc ttttggggag 60
5 ccactggcaa aaatggcacc tgttgtgaac cctgaaccca caggccaaca gtccggaccc 120
caggaactcg ttaatgcctg gcaaaagggc cgcggtatg cagagagcaa gcctggggct 180
gcaggactgc gcgctcgccg aacatcgcca tgcccgccgg tggagaaccc cacggggcac 240
cagcggcccc cgtgtgccac ccgcagtcgc ctgatccctg cgcgccggg atcggtgctg 300
gtgcagcgcg agaaggacat gtcagcctac aactggaact cctttggcct gcgctacggc 360
10 aggaggcagg tggcgcgggc ggcacggggc tga 393

<210> 24

<211> 396

<212> PRT

<213> Mouse

15 <400> 24

Met Ala Thr Glu Ala Thr Leu Ala Pro Asn Val Thr Trp Trp Ala Pro
1 5 10 15
Ser Asn Ala Ser Gly Cys Pro Gly Cys Gly Val Asn Ala Ser Asp Asp
20 25 30
20 Pro Gly Ser Ala Pro Arg Pro Leu Asp Ala Trp Leu Val Pro Leu Phe
35 40 45
Phe Ala Thr Leu Met Leu Leu Gly Leu Val Gly Asn Ser Leu Val Ile
50 55 60
Tyr Val Ile Cys Arg His Lys His Met Gln Thr Val Thr Asn Phe Tyr
25 65 70 75 80
Ile Ala Asn Leu Ala Ala Thr Asp Val Thr Phe Leu Leu Cys Cys Val
85 90 95
Pro Phe Thr Ala Leu Leu Tyr Pro Leu Pro Ala Trp Val Leu Gly Asp
100 105 110

Phe Met Cys Lys Phe Val Asn Tyr Ile Gln Gln Val Ser Val Gln Ala
115 120 125

Thr Cys Ala Thr Leu Thr Ala Met Ser Val Asp Arg Trp Tyr Val Thr
130 135 140

5 Val Phe Pro Leu Arg Ala Leu His Arg Arg Thr Pro Arg Leu Ala Leu
145 150 155 160

Ala Val Ser Leu Ser Ile Trp Val Gly Ser Ala Ala Val Ser Ala Pro
165 170 175

Val Leu Ala Leu His Arg Leu Ser Pro Gly Pro Arg Thr Tyr Cys Ser
10 180 185 190

Glu Ala Phe Pro Ser Arg Ala Leu Glu Arg Ala Phe Ala Leu Tyr Asn
195 200 205

Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Ala Thr Cys Ala Cys Tyr
210 215 220

15 Gly Ala Met Leu Arg His Leu Gly Arg Ala Ala Val Arg Pro Ala Pro
225 230 235 240

Thr Asp Gly Ala Leu Gln Gly Gln Leu Leu Ala Gln Arg Ala Gly Ala
245 250 255

Val Arg Thr Lys Val Ser Arg Leu Val Ala Ala Val Val Leu Leu Phe
20 260 265 270

Ala Ala Cys Trp Gly Pro Ile Gln Leu Phe Leu Val Leu Gln Ala Leu
275 280 285

Gly Pro Ser Gly Ala Trp His Pro Arg Ser Tyr Ala Ala Tyr Ala Val
290 295 300

25 Lys Ile Trp Ala His Cys Met Ser Tyr Ser Asn Ser Ala Leu Asn Pro
305 310 315 320

Leu Leu Tyr Ala Phe Leu Gly Ser His Phe Arg Gln Ala Phe Cys Arg
325 330 335

Val Cys Pro Cys Cys Arg Gln Arg Gln Arg Arg Pro His Thr Ser Ala

340 345 350
His Ser Asp Arg Ala Ala Thr His Thr Val Pro His Ser Arg Ala Ala
355 360 365
His Pro Val Arg Ile Arg Ser Pro Glu Pro Gly Asn Pro Val Val Arg
5 370 375 380
Ser Pro Cys Ala Gln Ser Glu Arg Thr Ala Ser Leu
385 390 395
<210> 25
<211> 1188
10 <212> DNA
<213> Mouse
<400> 25
atggccaccg aggcgacatt ggctcccaat gtgacctggt gggctccgtc caacgcttca 60
ggatgccag gctgcggtgt caacgcctcg gatgaccag gctctgcgcc aaggcccctg 120
15 gatgcctggc tggttccctt gtttttcgct acactcatgt tgcttgggct ggtcggaaac 180
tcattggtca tctacgttat ctgccgccac aagcacatgc agacagttac caacttctac 240
atcgctaacc tggctgccac agacgtcaact ttcctactgt gctgcgtgcc cttcaccgca 300
ctcctctacc cgctgccgc ctgggtgctg ggagacttca tgtgcaaatt cgtcaactac 360
atccagcagg tctcggtgca agccacatgt gccactctga cggccatgag tgtggaccgc 420
20 tggatatgta ctgtgttccc gctgcgtgca cttcaccgcc gcaactccgc cctggccctg 480
gctgtcagcc tcagcatctg ggtggggtca gcagctgtgt cggcccgggt gctggccctg 540
caccgcctgt cgccagggcc tcgcacctac tgcagcgagg cgtttcccag ccgcgccctg 600
gagcgcgct tcgcgtcta caacctgctg gctctatatc tgtgccgct gctgccacc 660
tgcgctgct acggcgccat gctgcgccac ctgggccgtg cggtgtacg ccccgaccc 720
25 actgacggcg ccctgcaggg acagtgccta gcacagcgc cgggagcagt gcgcaccaag 780
gtctcccggc tgggtggcgc tgtcgtcctg ctcttcgccg cctgctgggg cccgatccag 840
ctgttcctgg tgcttcaagc cctgggcccc tgggggcct ggcaccctcg aagctatgcc 900
gcctacgcgg tcaagatctg ggctcactgc atgtcctaca gcaactcggc gctcaatccg 960
ctgctctatg ctttctggg ttacacttc agacaggcct tctgccgct gtgccctgc 1020

16/16

tgccggcaac gccagcgccg gccccacacg tcagcgcaact cggaccgagc tgcaactcac 1080
actgtgccgc acagccgtgc tgcgcacct gtgcggatca ggagcccgga gcctgggaac 1140
cctgtgggtgc gctcgccctg cgctcagagt gaacgcactg cctcactc 1188

<210> 26

5 <211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

10 <400> 26

tccccacagt cccaggacac aatcct 26

<210> 27

<211> 26

<212> DNA

15 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 27

caccagcgca agcagcctgg gatgct 26

20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02615

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N 15/12, 1/21, C07K 14/47, 16/18, C12P 21/02, G01N 33/53, A61K 38/00, 45/00, 48/00, A61P 35/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N 15/00-15/90, C07K 14/00-14/825

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|------------------------------|
| P, X | WO, 00/24890, A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 04 May, 2000 (04.05.00), & AU, 9962306, A | 1-28 |
| X A | Maria de Fatima Bonaldo et al., "Normalization and Subtraction: Two Approaches to Facilitate Gene Discovery", Genome Res. (1996), Vol.6, No.9, pages 791 to 806. | 10, 12, 13 1-9, 11, 14-28 |
| X A | Ande West et al., "Chromosome Localization and Genomic Structure of the KiSS-1 Metastasis Suppressor Gene (KISS1)", Genomics (1998), Vol.54, pages 145 to 148 | 1-18, 26-28 19-25 |
| P, A | WO, 00/50563, A2 (Merck & Co., Inc.), 31 August, 2000 (31.08.00) (Family: none) | 1-28 |
| A | WO, 98/03548, A1 (Astra Pharma Inc.), 29 January, 1998 (29.01.98), & AU, 9737115, A & EP, 912610, A1 | 1-28 |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not
considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing
date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is
cited to establish the publication date of another citation or other
special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other
means

"P" document published prior to the international filing date but later
than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or
priority date and not in conflict with the application but cited to
understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered novel or cannot be considered to involve an inventive
step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be
considered to involve an inventive step when the document is
combined with one or more other such documents, such
combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
14 June, 2001 (14.06.01)

Date of mailing of the international search report
26 June, 2001 (26.06.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/02615

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| T | Tetsuya OHTAKI et al., "Metastasis suppressor gene <i>KISS-1</i> encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor", <i>Nature</i> , (May, 2001), Vol.411, pages 613 to 617 | 1-28 |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/12, 1/21, C07K 14/47, 16/18, C12P 21/02, G01N 33/53, A61K 38/00, 45/00, 48/00, A61P 35/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl¹ C12N 15/00-15/90, C07K 14/00-14/825

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------------------|
| P, X | WO, 00/24890, A1 (武田薬品工業株式会社) 4. 5月. 2000 (04. 05. 00) & AU, 9962306, A | 1-28 |
| X A | Maria de Fatima Bonaldo et al. "Normalization and Subtraction: Two Approaches to Facilitate Gene Discovery.", Genome Res. (1996) Vol. 6, No. 9, p. 791-806 | 10, 12, 13 1-9, 11, 14-28 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

14. 06. 01

国際調査報告の発送日

26.06.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

| C (続き) . 関連すると認められる文献 | | |
|-----------------------|---|-----------------------------|
| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
| X A | Ande West et al. "Chromosome Localization and Genomic Structure of the KiSS-1 Metastasis Suppressor Gene(KISS1).", Genomics(1998)Vol. 54, p. 145-148 | <u>1-18, 26-28</u> 19-25 |
| P, A | WO, 00/50563, A2(MERCK & CO., INC.) 31. 8月. 2000(31. 08. 00) (ファミリーなし) | 1-28 |
| A | WO, 98/03548, A1(ASTRA PHARMA INC.) 29. 1月. 1998(29. 01. 98) & AU, 9737115, A & EP, 912610, A1 | 1-28 |
| T | Tetsuya Ohtaki et al. "Metastasis suppressor gene <i>KiSS-1</i> encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor.", NATURE(2001, May)Vol. 411, p. 613-617 | 1-28 |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☒ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.